

Aus dem Institut für Klinische Physiologie
Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. med. K. Hierholzer

**EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN
ZUR
ELEKTRISCHEN IMPEDANZ
DES DICKDARM-EPITHELS DER RATTE**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Jörg-Dieter Schulzke
aus Berlin

1983





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546623_0016

Aus dem Institut für Klinische Physiologie, Klinikum Steg-
litz der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. med. K. Hierholzer

Experimentelle Untersuchungen zur elektrischen Impedanz des
Dickdarm - Epithels der Ratte

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Jörg - Dieter Schulzke
Berlin

Referent : Prof. Dr.med. Dr.rer.nat. U. Hegel

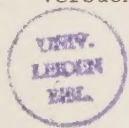
Korreferent : Prof. Dr. med. E. O. Riecken

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am : 28.1.1983

Meinen Eltern

	<u>Inhaltsverzeichnis</u>	<u>Seite</u>
1	<u>Liste der verwendeten Abkürzungen</u>	9
2	<u>Einleitung</u>	11
3	<u>Methoden</u>	14
3.1	Einführung	14
3.1.1	Versuchskollektive	14
3.1.2	Vergleich des intakten mit dem gestrippten Rectum	16
3.1.3	Segmentale Unterschiede der elektrischen Eigenschaften	17
3.1.4	Histologie und Morphometrie des Dickdarmes der Ratte	17
3.2	Versuchstiere und Versuchstierhaltung	18
3.3	Narkose	19
3.4	In vivo - Meßplatz	19
3.4.1	Perfusionsanordnung	19
3.4.2	Spannungsmessung in vivo	22
3.5	Strippen	22
3.6	In vitro - Meßplatz	23
3.6.1	Epithelkammer	23
3.6.2	Epithelcontainer	25
3.6.3	Strom- und Spannungselektroden	26
3.6.4	Begasungsaufsatz	26
3.6.5	Erzeugung und Messung des Stromes	27
3.6.6	Messung der spontanen transepithelialen elektrischen Spannung	29
3.6.7	Messung des Kurzschlußstromes	29
3.6.8	Korrektur des Kurzschlußstromes	31
3.6.9	Messung der Wechselspannung	32
3.6.10	Verzeichnis der verwendeten Geräte und Hersteller	34
3.6.11	Datenverarbeitung im on line - Betrieb	36
3.7	Ablauf des in vitro - Versuches	37



3.7.1	Nullabgleich der Meßgeräte	37
3.7.2	Messung des Badwiderstandes	37
3.7.3	Korrekturen	38
3.7.4	Messung am Epithel	42
3.7.5	Auswertung der Impedanzkurven	43
3.7.6	Versuchsauswertung im off line - Betrieb	46
3.8	Versuchsablauf	47
3.8.1	Vergleich des intakten und gestrippten Rectum	47
3.8.2	Segmentale Unterschiede einiger elektrophysiologischer Eigenschaften des Dickdarmepithels	49
3.9	Histologie und Morphometrie des Dickdarmes der Ratte	50
3.9.1	Histologische Aufarbeitung der Darmstücke	50
3.9.2	Morphometrie der Darmstücke	51
3.10	Lösungen	54
3.11	Statistische Methoden	56
4	<u>Ergebnisse</u>	57
4.1	Einführung	57
4.2	Funktionserhaltungszeit des Rectum in vitro	58
4.3	Einfluß des Strippens am Rectum	60
4.3.1	Einfluß des Strippens auf die spontane trans-epitheliale elektrische Spannung (Ψ^{ms})	66
4.3.1.1	Einfluß auf Ψ_{max}^{ms}	66
4.3.1.2	Einfluß auf $\Psi_{initial}^{ms}$	67
4.3.1.3	Einfluß auf Ψ^{ms} (in vitro gemessen)	68
4.3.2	Einfluß des Strippens auf den Kurzschlußstrom	70
4.3.3	Einfluß des Strippens auf den Totalwiderstand	72
4.3.4	Einfluß des Strippens auf den Parallelwiderstand	74
4.3.5	Einfluß des Strippens auf den Serienwiderstand	77
4.3.6	Einfluß des Strippens auf die apparente Parallelkapazität	80

4.3.7	Einfluß des Strippens auf die Lage des Mittelpunktes der Ortskurven der Impedanz (Winkel α)	83
4.4	Segmentale Heterogenität einiger elektrophysiologischer Eigenschaften des Dickdarmes der Ratte	85
4.4.1	Segmentale Unterschiede der spontanen transepithelialen elektrischen Spannung	88
4.4.2	Segmentale Unterschiede des Totalwiderstandes	92
4.4.3	Segmentale Unterschiede des Parallelwiderstandes	96
4.4.4	Segmentale Unterschiede des Serienwiderstandes	100
4.4.5	Segmentale Unterschiede der apparenten Parallelkapazität	104
4.4.6	Segmentale Unterschiede der Lage des Mittelpunktes der Ortskurven der Impedanz (Winkel α)	108
4.5	Histologie des Dickdarmes der Ratte	110
4.6	Morphometrie am Dickdarm der Ratte	115
4.6.1	Einfluß des Strippens auf die morphometrischen Parameter	117
4.6.2	Segmentale Unterschiede der morphometrischen Parameter	119
5	<u>Diskussion</u>	121
5.1	Einführung	121
5.2	Verbesserung der experimentellen Methoden	122
5.2.1	Lösung	122
5.2.2	Begasung	123
5.2.3	Strippen	124
5.3	Anschluß der in vitro- an die in vivo - Daten	129
5.3.1	Wahl der Vergleichsparameter	129
5.3.2	Widerstandsmessung in vivo	130
5.3.3	Zeitgang von I_{sc} und Ψ^{ms} in vitro	131
5.3.4	Widerstandsmessung in vitro	132
5.3.5	Vergleich der Absolutwerte der Widerstände	133
5.3.6	Absolutwerte für I_{sc} in vitro	135

5.3.7	Initiale Transienten von I_{sc} in vitro	135
5.3.8	Zusammenfassung	139
5.4	Messung der elektrischen Impedanz	141
5.4.1	Leistungsfähigkeit der elektrischen Impedanzmessung	141
5.4.2	Methoden der Bestimmung von elektrischen Impedanzen	141
5.4.3	Interpretation der elektrischen Impedanzmessungen mit Hilfe elektrisch äquivalenter Schaltkreise	143
5.4.4	Bedeutung der Impedanzmessung am Dickdarm der Ratte	149
5.5	Das Strippen	151
5.6	Segmentale Heterogenität der elektrischen Meßparameter	154
5.7	Diskussion der morphometrischen Ergebnisse	161
6	<u>Anhang</u>	167
6.1	Einfluß von mit dem Epithel in Serie liegenden Widerständen auf die Messung des Kurzschlußstromes	167
7	<u>Zusammenfassung</u>	172
8	<u>Literaturverzeichnis</u>	175
9	<u>Lebenslauf</u>	182

1 Liste der verwendeten Abkürzungen

Ψ^{ms}	= Spontane transepitheliale elektrische Spannung
Ψ_{max}^{ms}	= Maximale Ψ^{ms} in vivo
$\Psi_{initial}^{ms}$	= Erster Meßwert für Ψ^{ms} in vitro nach Einspannen des Epithels in die Meßkammer
I_{sc}	= Kurzschlußstrom ($I_{short\ circuit}$)
R_t, R_p, R_s, C_p	= Totalwiderstand, Parallelwiderstand, Serienwiderstand, parallele Kapazität der elektrischen Ersatzschaltung (vgl. 3.7.5)
R_{vc}	= Der durch Division von Ψ^{ms} durch I_{sc} erhaltene Widerstand (vc für "voltage clamp" auf 0mV)
f_c	= Charakteristische Frequenz eines Tiefpass
F_{makro}	= Makroskopische Darmwandoberfläche
$F_{Epithel}$	= Mikroskopische Darmwandoberfläche unter Berücksichtigung der Krypten
$F_{lum\ Mem}$	= Oberfläche der luminalen Membran unter Berücksichtigung der Krypten und der Mikrovilli
$\bar{x}$	= Mittelwert
$S_{\bar{x}}$	= Mittlerer Fehler des Mittelwertes
n	= Stichprobenumfang
ν	= Zahl der Freiheitsgrade (in einer Stichprobe = $n - 1$, in zwei Stichproben = $n_1 + n_2 - 2$)
H_0	= Nullhypothese, d.h. Annahme, daß den beiden Stichproben bezüglich der Mittelwerte $\bar{x}_1$ und $\bar{x}_2$ gleiche Grundgesamtheiten zugrundeliegen

H_A	= Alternativhypothese, d.h. Annahme, daß den beiden Stichproben bezüglich der Mittelwerte $\bar{x}_1$ und $\bar{x}_2$ verschiedene Grundgesamtheiten zugrundeliegen
P	= Wahrscheinlichkeit, mit der zwei Stichproben der gleichen Grundgesamtheit angehören ($0 \leq P \leq 1$)
DC	= Gleichstrom
AC	= Wechselstrom
J_{Na}^{net}	= Na - Netto - Transport
R_{JNa}	= Widerstand, berechnet nach $R_{JNa} = \psi^{ms} / I_{sc}$, wobei I_{sc} aus J_{Na}^{net} in vivo errechnet ist.
B	= Schichtdicke des subepithelialen Gewebes (vgl. 3.9.2)
t	= Tiefe einer Krypte (vgl. 3.9.2)
l	= Luminaler Durchmesser einer Krypte (vgl. 3.9.2)
d	= Außendurchmesser einer Krypte (vgl. 3.9.2)
φ	= Neigungswinkel einer Krypte zur Senkrechten auf die Oberfläche (vgl. 3.9.2)
N_{mm}^{Kr}	= Zahl der Krypten pro 1 mm Oberflächenlänge (vgl. 3.9.2)
N_{mm}^{Kr2}	= Zahl der Krypten pro 1 mm ² Oberfläche (vgl. 3.9.2)
OF	= Oberflächenfaktor (vgl. 3.9.2)

2 Einleitung

Die Grenzstrukturen zwischen dem Organismus und seiner Umgebung sind die epithelialen Gewebe. Mit ihren spezifischen Transporteigenschaften sind die Epithelien an der stofflichen Homöostase des Körpers wesentlich beteiligt. Dabei spielt u.a. der aktive Transport von Salzen, und das bedeutet vor allem von Ionen, auch entgegen chemischen Gradienten und elektrischen Spannungen eine wichtige Rolle. Insofern ist auch die elektrische Leitfähigkeit des Epithels eine bedeutsame Größe, weil sie das Ausmaß des stets gleichzeitig mit dem aktiven Transport stattfindenden passiven Ionentransportes bestimmt, d.h. desjenigen Anteils am gesamten Transport, der allein von chemischen Gradienten oder transepithelialen elektrischen Spannungen getrieben wird.

Das Epithel des Darmes vermittelt den Stoffaustausch zwischen Körper und Nahrung. Während der Dünndarm mehr als 90% der Elektrolyte und die Nährstoffe resorbiert, erfolgt im Dickdarm die Feineinstellung der Elektrolytzusammensetzung des Darminhaltes.

Nachdem am Dickdarm der Ratte eine segmentale Heterogenität der spontanen transepithelialen elektrischen Spannung und der Na^+ - Aufnahme der Epithelzellen aus dem Lumeninhalt nachgewiesen worden war (20, 3) und nachdem außerdem eine solche Heterogenität auch für die Wirkung des Diuretikums Amilorid auf diese beiden Parameter gesichert worden war (20, 3), stellte sich die Frage, ob auch für die elektrische Leitfähigkeit segmentale Unterschiede bestünden. Darüberhinaus war es wichtig zu untersuchen, inwieweit die an der Ratte früher in vivo erhobenen Daten mit den in der vorliegenden Arbeit in vitro gewonnenen Meßergebnissen vergleichbar sind. Zu diesem Zweck wurde an einem Tierkollektiv eine unmittel-

bare Fortsetzung von in vivo unter definierten Bedingungen begonnenen Experimenten an den in vitro überlebenden Darmsegmenten vorgenommen und ein Anschluß der jeweiligen Meßwerte aneinander versucht.

Am Rattendarm waren in vitro - Experimente von jeher durch eine im Vergleich zum Kaninchencolon oder gar zu Kaltblüterpräparaten geringe Funktionserhaltungszeit nach Unterbrechung der Blutversorgung behindert. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit der Verbesserung versuchstechnischer Bedingungen besondere Aufmerksamkeit gewidmet. So wurde die Begasungsanlage schon im Rahmen der Vorversuche zweimal verändert. Die benutzte Darmlösung wurde nach Vorversuchen in ihrer Zusammensetzung modifiziert (vgl. 3.10). Um die Sauerstoffversorgung des Epithels zu verbessern, wurden Teile des subepithelialen Gewebes entfernt (vgl. 3.5). Der Einfluß dieser als "Strippen" bezeichneten Präparationstechnik auf die elektrischen Parameter des Darmes wurde im Rahmen dieser Arbeit elektrophysiologisch und morphometrisch untersucht.

Die in der vorliegenden Arbeit mitgeteilten elektrophysiologischen Messungen haben einen besonderen Stellenwert dadurch, daß der elektrische Widerstand des Epithels und seiner es tragenden bindegewebigen und muskulären Strukturen hier nicht, wie bisher überwiegend üblich, mit Gleichstrompulsen, sondern mit Wechselstrom eines breiten Frequenzbereiches bestimmt wurden. Durch die Verbindung dieses Verfahrens mit der Stripptechnik und deren quantitativer Erfassung in der Morphometrie war es an dem untersuchten Epithel erstmals möglich, einen mittleren Wert für den spezifischen elektrischen Volumenwiderstand des subepithelialen Bindegewebes anzugeben und zugleich nachzuweisen, daß das Wechselstrom-Meßverfahren auf elektrischem Wege eine Trennung in

elektrisch reaktive und nicht-reaktive Darmwandkomponenten erlaubt, die sonst nur durch zeitraubende und das Epithel mechanisch wie biologisch belastende Präparationsarbeit erreichbar ist.

3 Methoden

3.1 Einführung

3.1.1 Versuchskollektive

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Messungen an 8 Versuchskollektiven vorgenommen. Die Benennung der Kollektive, die Typen von Experimenten und die Lokalisation der Segmente des Darmes, aus denen die Darmstücke für die 8 Kollektive entnommen wurden, zeigt Tab. 1 . Aus der Tab.1 gehen weiterhin die Art der Präparation (intakt oder gestrippt) sowie die Meßmethode (elektrisch in vivo oder in vitro oder morphometrisch) hervor. Die Darmlänge wurde zwischen dem Übergang des Caecum in das Colon ascendens und dem Anus gemessen.

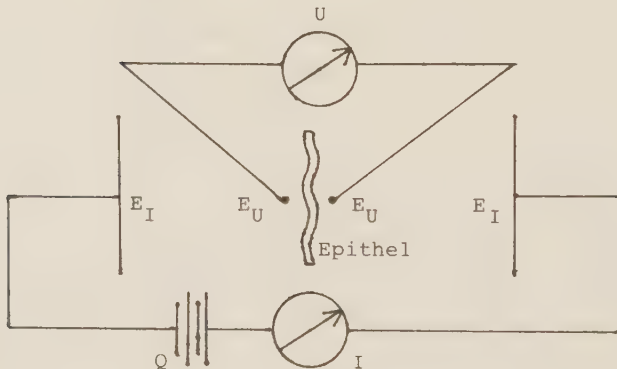
Tab.1 Übersicht über die Versuchskollektive

Kol- lek- tiv segment	Darm- seg- ment	n	Meß- art	in vivo	in vi- tro	in- takt	ge- str.	Hi- sto- lo- gie	Darm- länge $\bar{x} \pm S-x$ in cm	Segmentlokalisierung ○ Lage des 6 mm breiten Segmentes im Darm. proximale Längenangabe: zwischen dem distalen Ende des Caecum und der Mitte des untersuchten Segmentes. distale Längenangabe: Mitte des Segmentes bis zum Anus
1	Rectum	15	elek- trisch	+	+				$16,4 \pm 0,28$	Caecum 12,7cm —○ 3,7cm Anus
2	Rectum	18	elek- trisch	+	+		+		$16,5 \pm 0,36$	Caecum 12,9cm —○ 3,6cm Anus
3	Colon descen- dens	7	elek- trisch		+		+		$15,9 \pm 0,51$	Caecum 9,0cm —○ 6,9cm Anus
4	Colon ascen- dens	8	elek- trisch		+		+		$17,3 \pm 0,45$	Caecum 3,6cm —○ 13,7cm Anus
5	Rectum	7	mor- phome- trisch			+		+	$15,4 \pm 0,37$	Caecum 12,3cm —○ 3,1cm Anus
6	Rectum	7	mor- phome- trisch				+		$15,4 \pm 0,37$	Caecum 12,3cm —○ 3,1cm Anus
7	Colon descen- dens	7	mor- phome- trisch				+		$15,4 \pm 0,37$	Caecum 8,1cm —○ 7,3cm Anus
8	Colon ascen- dens	7	mor- phome- trisch				+		$15,4 \pm 0,37$	Caecum 3,5cm —○ 11,9cm Anus

3.1.2 Vergleich des intakten mit dem gestrippten Rectum

Strippen ist das präparative Entfernen von Teilen des subepithelialen Gewebes der Darmwand (vgl. 3.5). Ein auf diese Weise behandeltes Kollektiv (Kollektiv 2) wurde mit einem Normalkollektiv (Kollektiv 1) verglichen. Zunächst wurde in beiden Kollektiven in vivo mit einer Perfusionsanordnung (vgl. 3.4.1) über mehrere Stunden die transepitheliale Spannung gemessen, um den Grad der durch die Narkose erfolgten Aldosteronstimulation ermessen zu können (22). Anschließend wurde dem Tier das Rectum zur in vitro - Messung entnommen und im Kollektiv 1 intakt belassen, im Kollektiv 2 gestrippt. Darauf wurde in beiden Kollektiven in vitro mit einer 4-Elektroden-Anordnung nach Ussing & Zerahn (51) (vgl. Abb. 1) die transepitheliale Spannung, der Kurzschlußstrom und die elektrische Impedanz des Darmes gemessen.

Abb.1 4 - Elektrodenanordnung nach Ussing & Zerahn



Q : Stromquelle
 I : Strommeßgerät
 U : Spannungsmeßgerät

E_I : Stromelektroden
 E_U : Spannungsmeßeletroden

3.1.3 Segmentale Unterschiede der elektrischen Eigenschaften

Es wurden Darmstücke aus drei verschiedenen Segmenten miteinander verglichen, dem Rectum (Kollektiv 2, identisch mit dem in 3.1.2 benutzten Kollektiv 2), dem Colon descendens (Kollektiv 3) und dem Colon ascendens (Kollektiv 4). Alle Darmstücke der drei Kollektive wurden gestrippt.

Die Darmstücke aus dem Colon descendens und dem Colon ascendens wurden ohne in vivo - Messung unmittelbar nach der Narkose dem Tier entnommen und gestrippt. Dann wurde mit der 4 - Elektrodenanordnung in vitro gemessen.

3.1.4 Histologie und Morphometrie des Dickdarmes der Ratte

Darmstücke aus 3 Darmsegmenten wurden für 4 Kollektive histologisch aufgearbeitet. Intakte Darmstücke aus dem Rectum für Kollektiv 5, gestrippte Darmstücke aus dem Rectum für Kollektiv 6, gestrippte Darmstücke aus dem Colon descendens für Kollektiv 7 und gestrippte Darmstücke aus dem Colon ascendens für Kollektiv 8.

Die Morphometrie erfolgte mit einem Lichtmikroskop mit Meßokular. Ausgemessen wurde die Dicke der Bindegewebsschicht, die Zahl der Krypten pro 1mm Oberfläche im Schnitt, die Tiefe der Krypten und der Durchmesser der Krypten. Daraus wurde die Zahl der Krypten pro 1mm^2 Oberfläche des Epithels und der Oberflächenfaktor abgeleitet.

3.2 Versuchstiere und Versuchstierhaltung

Als Versuchstiere dienten serum-pathogen-freie männliche Albino Wistar Ratten (Zentralinstitut für Versuchstierzucht, Hannover). Die mittleren Körpergewichte sind in Tab.2 aufgeführt.

Tab.2 Körpergewicht der Versuchstiere

Kollektiv	Körpergewicht der Versuchstiere ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$)	n
1	344 $\pm$ 12,2 g	15
2	341 $\pm$ 5,66 g	18
3	247 $\pm$ 8,99 g	7
4	272 $\pm$ 4,23 g	8
5	399 $\pm$ 16,2 g	7
6	399 $\pm$ 16,2 g	7
7	399 $\pm$ 16,2 g	7
8	399 $\pm$ 16,2 g	7

Die Ratten erhielten Standardfutter "Altromin Standard Diät 1320" (Fa. Altromin, Lage / Lippe) und Leitungswasser ad libidum. Die Ratten wurden frühestens am 3.Tag nach ihrer Ankunft in Berlin zum Versuch herangezogen.

3.3 Narkose

Alle Ratten wurden durch 5min. Inhalation von 2 Vol% 2-Brom-2-chlor-1,1,1-trifluoräthan (Halothan^(R) Hoechst) und 98 Vol% O₂ narkotisiert. Das Gasgemisch wurde in einem Halothanverdampfer "Vapor Halothan" (Fa. Dräger, Lübeck) gemischt und durch Einleiten in eine kleine Plexiglasbox appliziert. Aufrechterhalten wurde die Narkose durch intraperitoneale Gabe von Pentobarbital-Na (Nembutal^(R), Ceva GmbH) mit einer Dosierung von initial 1 ml pro kg Körpergewicht. In den Kollektiven 1 und 2 wurde die Narkose durch stündliche Nachinjektion von 0,3 ml pro kg Körpergewicht über eine Dauer von 7 Stunden ausgedehnt.

3.4 In vivo - Meßplatz

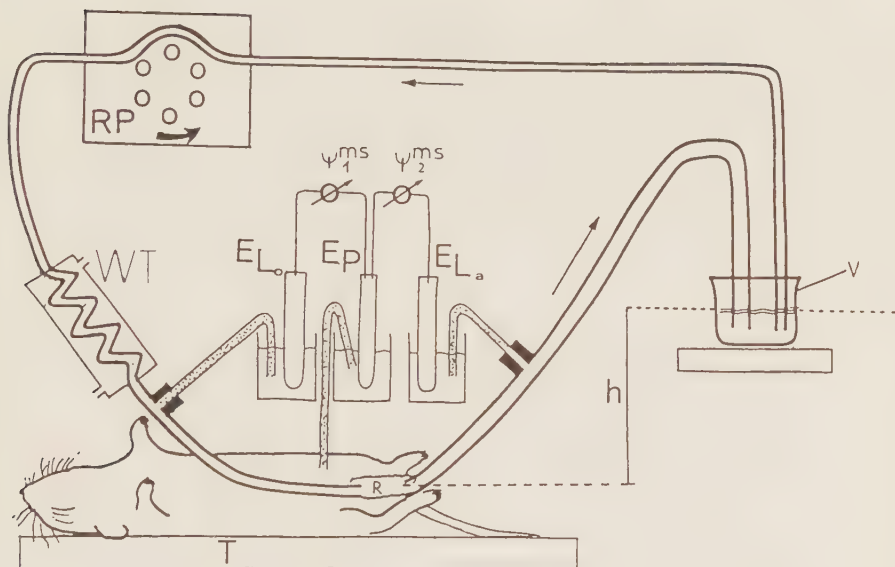
Der in vivo - Meßplatz diente der kontinuierlichen Messung der transepithelialen elektrischen Spannung (Ψ^{ms}) des Rectum mit Hilfe einer Perfusionsanordnung, ähnlich der von Fromm (18) angegeben.

3.4.1 Perfusionsanordnung (vgl. Abb. 2)

Die Ratte lag mit eröffneter Bauchhöhle auf einem temperierten Operationstisch (T). Das Perfusat wurde von einer Rollenkklusionspumpe nach Lutz (Fa. Stinzing, Würzburg) (RP) aus dem Vorratsgefäß (V, Vol. 20 ml) durch einen Weichplastikschlauch (Typ 040 116 - 0536 - 09, Fa. Technikon, Durchmesser 0,4 mm), der in ein T-Stück mündete, dem Rectum (R) zugeleitet. Das T-Stück wurde etwa 5 cm proximal des Anus der Ratte in den Darm eingebunden. Der Abzweig des T-Stückes diente der Aufnahme der Agarbrücke der proximalen Spannungselektrode (E_{Lo}). Im zuleitenden Weichplastikschlauch lag

ein Wärmetauscher (WT), der das Perfusat auf 37°C erwärmte. Der ableitende Schenkel der Perfusionsanordnung bestand aus einem mit einer Tabaksbeutelnaht im Anus der Ratte eingebundenen T-Stück, das die Agarbrücke der distalen Spannungselektrode (E_{La}) aufnahm und in einen Polyäthylenschlauch (Typ K 492, Durchmesser innen 2 mm) mündete. Der Polyäthylenschlauch leitete das Perfusat zurück in das Vorratsgefäß (V). Die Perfusion erfolgte also im geschlossenen System. Das Volumen des Schlauchsystems betrug 1,1 ml. Die Höhendifferenz (h) zwischen Darmlumen und Flüssigkeitsspiegel des Vorratsgefäßes bestimmte den hydrostatischen Druck im Lumen, der auf ca. 5 cm H₂O eingestellt wurde. Als Perfusat diente eine Ringer - ähnliche Lösung (Zusammensetzung vgl. 3.10), Darmlösung 2), die unter dem Gesichtspunkt gewählt wurde, bei isoosmolaler Gesamtkonzentration für die wichtigsten Elektrolyte möglichst geringe Konzentrationsunterschiede über dem Epithel auftreten zu lassen.

Abb. 2 Der in vivo - Meßstand



T: temperierter Operationstisch

R: Rectum der Ratte

V: Vorratsgefäß

h: Höhendifferenz zwischen Flüssigkeitsspiegel im Vorratsgefäß und Darmlumen

RP: Rollenokklusionspumpe

WT: Wärmetauscher

$E_{Lo/a}$: Spannungselektrode, im Lumen oral/aboral gelegen

E_p : Spannungselektrode, intraperitoneal gelegen

ψ_1^{ms} : Potentialdifferenz zwischen E_{Lo} und E_p

ψ_2^{ms} : Potentialdifferenz zwischen E_{La} und E_p

3.4.2 Spannungsmessung in vivo

Die indifferente Elektrode (E_p , Abb.2) lag frei in der Peritonealhöhle. Die elektrische Spannung zwischen mucosaler und serosaler Seite der Darmwand (Ψ^{ms}) wurde als Ψ_1^{ms} zwischen zuleitender Schleife der Perfusionsanordnung und freier Bauchhöhle bzw. als Ψ_2^{ms} zwischen ableitender Schleife der Perfusionsanordnung und freier Bauchhöhle auf 2 Kanälen eines 6-Kanal-Kompensationsschreibers (Typ 1060, Fa. Linseis Selb / Bayern, Eingangswiderstand 10^7 Ohm) kontinuierlich aufgezeichnet.

Die Spannungsübertragung erfolgte dabei mit Hilfe einer Meßkette bestehend aus einer Brücke (Länge 15 cm, Durchmesser innen 2 mm), die gefüllt war mit in Darmlösung zubereitetem 3 g%igem AgarAgar. Die Agarbrücke tauchte gemeinsam mit der Kalomel-elektrode des 6-Kanal-Kompensationsschreibers in 3 molare KCL - Lösung.

Die transepitheliale Spannung (Ψ^{ms}) des Rectums in vivo wurde aus Ψ_1^{ms} und Ψ_2^{ms} als arithmetisches Mittel errechnet.

3.5 Strippen

Die zum präparativen Entfernen von Teilen des serosalen Bindegewebes verwendete Technik entsprach weitgehend der von Nellans et al. (35) für das sog. "sub-totale Strippen" angegebenen.

Dazu wurde das entnommene Darmstück mit der Mucosa nach unten flach auf eine feste Unterlage gelegt. Dann wurde das Darmstück durch leichten Zug mit Hilfe der Kante eines Objektträgers in Längsrichtung gespannt

und mit einem Skalpell die serosale Bindegewebsschicht quer eingeschnitten, ohne die Epithelschicht zu verletzen. Infolge der Elastizität des Präparates klafften danach die Schnittränder aus Tunica serosa und Tunica muscularis deutlich auseinander, so daß sich diese beiden Schichten leicht mit einer Pinzette von der Tunica mucosa abziehen ließen. Der gesamte etwa 10 min. dauernde Prozeß fand bei Zimmertemperatur im Trockenen statt, d.h., das Präparat tauchte dabei nicht in Darmlösung, sondern lag, leicht mit Darmlösung benetzt, an der Luft.

Wie später lichtmikroskopisch gesichert werden konnte (vgl. 4.5), wurde so die Tunica serosa und die Tunica muscularis abgestrippt, während die Tunica mucosa vollständig erhalten blieb. Die Trennung fand also im submucösen Bindegewebe, der Tela submucosa, statt.

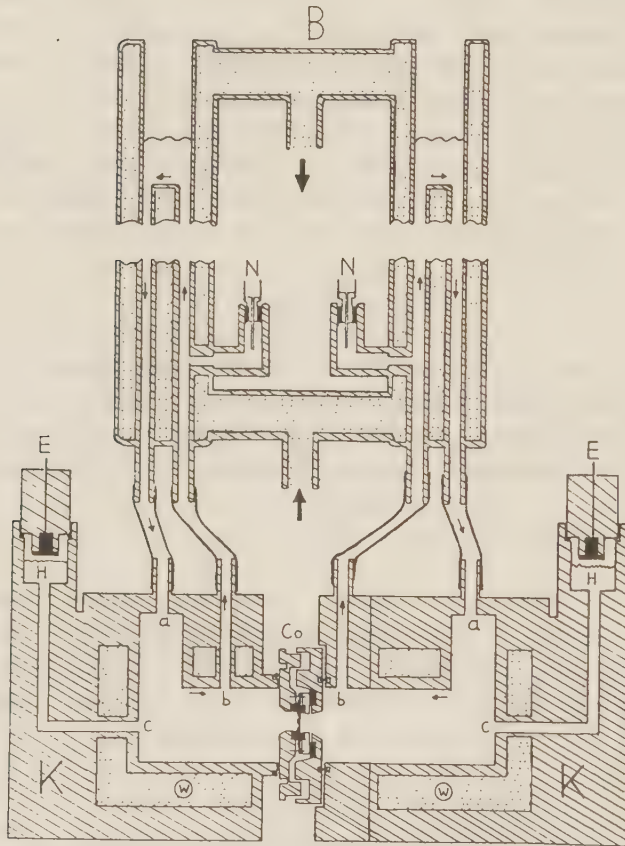
3.6 In vitro - Meßplatz

Die in vitro - Messung erfolgte nach dem Prinzip der 4-Elektroden-Anordnung nach Ussing & Zerahn (51). Dabei befand sich das Darmstück zwischen 2 mit leitender Lösung gefüllten Kammerhälften, in die auf jeder Seite je eine Strom- und eine Spannungselektrode eintauchten.

3.6.1 Epithelkammer (Abb. 3)

Die Epithelkammer bestand aus 2 Acrylglashälften (K), die durch eine Feder von außen gegeneinander gedrückt wurden. Zwischen den Hälften befand sich der Epithelcontainer (Co). Jede Kammer besaß einen zylindrischen Innenraum (mit den Maßen: Länge = 4,1 cm links, 4,8 cm rechts, Durchmesser = 2 cm). Das Füllungsvolumen der kompletten Kammer mit dem Begasungsaufsatz betrug 35 ml. Zwischen den beiden Wänden jeder Kam-

Abb. 3 Epithelkammer mit Container und Begasungsaufsatz



K = Kammerhälften

W = Wassermantel

Co = Epithelcontainer

B = Begasungsaufsatz

E = Stromelektroden

a = Zuleitung vom Begasungsaufsatz

b = Ableitung zum Begasungsaufsatz

c = Agarbrücke der Stromelektrode

H = Hohlzylinder der Stromelektrode mit 3 molarem KCL

N = Injektionsnadeln zum Einblasen des Gasgemisches

merhälfte zirkulierte das thermostatisch auf 37°C temperierte Wasser (W) des Wärmebades (Fa. Haake). Die gesamte Wandung jeder Kammerhälfte wurde von 5 Kanälen mit einem Innendurchmesser von 3 mm durchquert , von denen zwei (a und b) der Flüssigkeitsumwälzung und einer dem Füllen bzw. Entleeren der Kammer (in Abb. 3 nicht angeschnitten) dienten. Zwei weitere nahmen die Agarbrücke der Stromelektrode (c) und die Agarbrücke der Spannungselektrode (in Abb. 3 nicht angeschnitten) auf.

3.6.2 Epithelcontainer (Co, Abb. 3)

Der Epithelcontainer (Co) diente der Halterung des Darmstückes zwischen den beiden Kammerhälften und bestand aus drei Acrylglasteilen: der oberen Hälfte, der unteren Hälfte und dem Nadelkranz. In die Acrylglasteile waren Silicon - Gel - Ringe⁺ eingelassen, die schon bei sanftem Andruck an das Darmstück eine Abdichtung gewährleisteten. Die exponierte Darmwandfläche betrug bei einem Innendurchmesser der Silicon - Gel - Ringe von 6 mm 28,3 mm².

⁺ Neun Teilen A des Silicon - Gel 604 A (Wacker Chemie GmbH, München) wurde ein Teil B zugegeben und beide gut vermischt. Die eingerührten Luftblasen wurden mit Hilfe einer Vakuumpumpe entfernt. Nach Einbringen des Gemisches in die Form wurde das Silicon - Gel zum Aushärten drei Stunden lang bei 60°C inkubiert.

3.6.3 Strom- und Spannungselektroden (E, Abb. 3)

Die Strom- (E) und Spannungselektroden (nicht angeschnitten in Abb. 3) waren gesinterte Ag / AgCl - Elektroden (Hersteller: Annex Research Inc., USA; Durchmesser 6,5 mm), die in kleine mit 3 molarer KCl - Lösung gefüllte Hohlzylinder (H) eintauchten, in welche von unten die Agarbrücken (c) einmündeten. Die Agarbrücken waren Kanäle in der Kammer mit einem Innendurchmesser von 3 mm, gefüllt mit 2,5 g%igem AgarAgar, das mit der Darmlösung (vgl. 3.10) zubereitet war. Der Abstand der Stromelektroden (E) vom Darmstück betrug 4,5 cm links und 5,6 cm rechts und der Abstand der Spannungselektroden jeweils 4 mm.

3.6.4 Begasungsaufsatz (B, Abb. 3)

Die Begasung der Versuchslösung erfolgte mit Hilfe einer symmetrischen Glaskonstruktion (B) nach dem von Ussing & Zerahn (51) beschriebenen Prinzip. Über jeder Kammerhälfte mündeten zwei Glaskamine oben in ein gemeinsames zylindrisches Reservoir und kommunizierten unten mit dem Lumen der Kammerhälfte.

Ein Gasgemisch von 95 Vol% O₂ und 5 Vol% CO₂ wurde über Injektionsnadeln (N) unten in den epithelnahe inneren Kamin geleitet. Durch die treibende Kraft der aufsteigenden Gasblasen zirkulierte die Lösung aus der Kammer im inneren Kamin aufwärts und dann nun frisch begast im äußeren Kamin in die Kammer zurück und am Epithel vorbei wieder in den inneren Kamin hinein.

Durch die ausgeprägte Zirkulation der Lösung unmittelbar am Epithel entlang wurde angestrebt, unbe-

wegte und damit nicht oxygenierte Lösungsschichten vor dem Epithel zu verringern.

Die Glaswandung der Begasungskonstruktion war doppelwandig. Im Hohlraum zirkulierte das thermostatisch auf 37°C temperierte Wasser des Wärmebades (Fa. Haake).

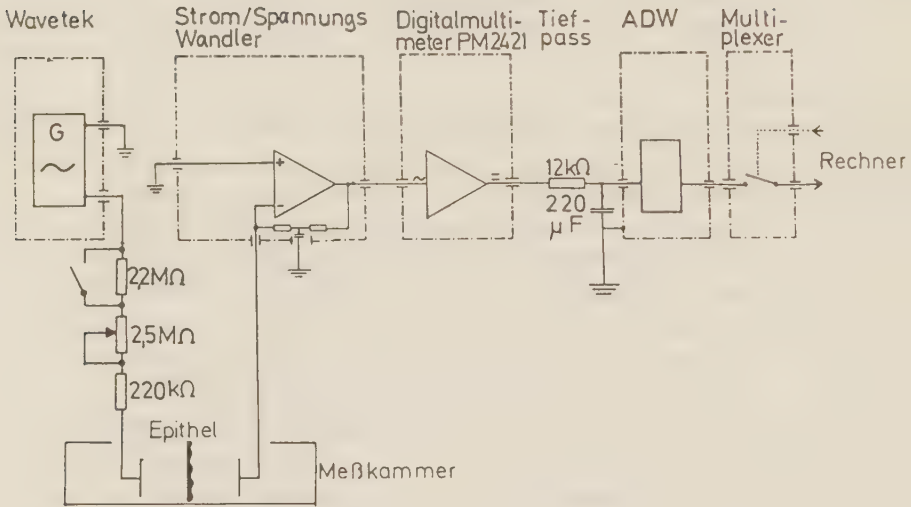
3.6.5 Erzeugung und Messung des Stromes (Abb. 4)

Der Wechselstrom wurde von einem Sinusgenerator (Wavetek) den Ag/AgCl - Elektroden über einen regelbaren Vorwiderstand (220 - 4920 k Ω) zugeleitet. Die Messung der Stromstärke erfolgte mit einem Strom/Spannungswandler mit einer Empfindlichkeit von 1,05 mV / 1 μ A . Die stromproportionale Ausgangsspannung wurde in einem Philips Digitalmultimeter PM 2421 gleichgerichtet und über einen RC - Tiefpass ($f_c = 0,0603$ Hz) dem Analog - Digital - Wandler (ADW) zugeleitet.

Die Stromstärke in der Kammer betrug im Mittel etwa 9 μ A (RMS) mit einem Variationsbereich von 5 - 13 μ A (RMS). Die Stromdichte über dem Epithel lag damit im Mittel etwa bei 31 μ A $\cdot$ cm⁻².

Die Frequenz des Wechselstromes wurde von einem Frequenzmeßgerät "Philips universal counter" gemessen.

Abb. 4 Erzeugung und Messung des Stromes



Die verwendeten Geräte sind mit ihren Herstellern und Spezifikationen im "Verzeichnis der verwendeten Geräte" unter 3.6.10 aufgeführt. Die Funktion der Geräte ist unter 3.6.5 beschrieben.

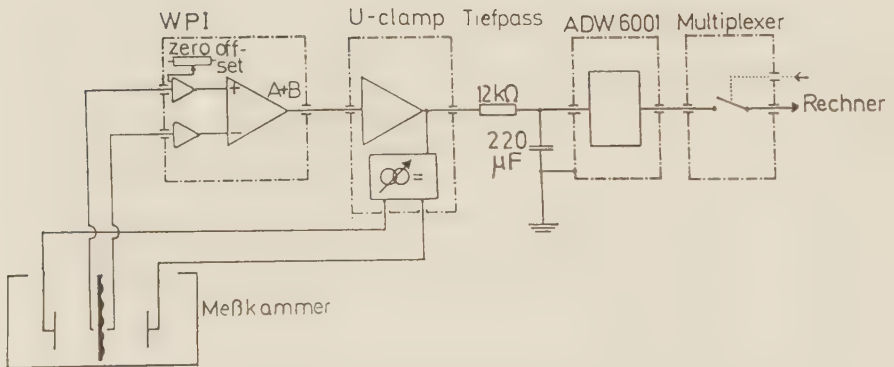
3.6.6 Messung der spontanen transepithelialen Spannung (ψ^{ms}) (vgl. Abb. 5)

Der Spannungsverstärker (WPI), dessen Eingangsstufen (Eingangswiderstand $10^{15} \Omega$, Ausgang niederohmig) den Ag / AgCl - Spannungselektroden (vgl. 3.6.3) unmittelbar aufsaßen, gab das verstärkte Spannungssignal über dem Epithel über seinen Differenz Ausgang (A - B) auf das "Voltage clamp" - Gerät (U - clamp). Das "Voltage clamp" - Gerät arbeitete für die Messung von ψ^{ms} im "Arbeitsmodus 1" , d.h. als reiner Spannungsverstärker, und leitete das Signal über einen RC - Tiefpass ($f_c = 0,0603 \text{ Hz}$) auf den Analog - Digital - Wandler (ADW 6001). Der Tiefpass diente der Ausfilterung der Wechselspannungskomponente der transepithelialen Spannung in diesem Pfad, da hier die Messung des Gleichspannungsanteils erfolgen sollte.

3.6.7 Messung des Kurzschlußstromes (I_{sc}) (vgl. Abb. 5)

In seinem "Arbeitsmodus 2" diente das "Voltage clamp" - Gerät der Messung des Kurzschlußstromes. Dazu lieferte das Gerät einen Gleichstrom von genau der Größe, daß die zwischen den Spannungselektroden vom Spannungsverstärker (WPI) und damit vom "Voltage clamp" - Gerät registrierte Spannung Null betrug ("Kurzschlußfall").

Abb. 5 Messung der transepithelialen elektrischen Spannung
und des Kurzschlußstromes



Die verwendeten Geräte sind mit ihren Herstellern und Spezifikationen im "Verzeichnis der verwendeten Geräte" unter 3.6.10 aufgeführt. Die Funktion der Geräte ist unter 3.6.6 und 3.6.7 beschrieben.

3.6.8 Korrektur des Kurzschlußstromes

Da im "Kurzschlußfall" (in 3.6.7) die Spannung nicht über der Darmwand, sondern zwischen den beiden Spannungselektroden auf Null eingestellt wurde, war folgende Korrektur der in 3.6.7 gemessenen Kurzschlußströme notwendig (vgl. 6.1), durch die der Beitrag der Badflüssigkeit zum Gesamtwiderstand kompensiert wurde:

$$I_{SC}(\text{korrigiert}) = I_{SC}(\text{gemessen}) \cdot \frac{R_{\text{Darmwand}} + R_{\text{Bad}}}{R_{\text{Darmwand}}}$$

$I_{SC}(\text{korrigiert})$ = tatsächlicher Kurzschlußstrom bei Spannung Null über dem Darmstück.

$I_{SC}(\text{gemessen})$ = nach 3.6.7 gemessener Kurzschlußstrom (Spannung 0 mV zwischen den Spannungselektroden).

R_{Bad} = Widerstand der nur mit Lösung gefüllten Kammer ohne Darmstück, der aktuell vor jedem Versuch gemessen wurde.

R_{Darmwand} = Widerstand des Darmstückes in der Meßkammer; ergibt sich aus:

$$R_{\text{Darmwand}} = R_{\text{gesamt}} - R_{\text{Bad}}$$

R_{gesamt} = Totalwiderstand zwischen den beiden Spannungselektroden (bestehend aus dem Darmstück und der Lösung). Ergibt sich aus:

$$R_{\text{gesamt}} = \frac{\psi^{\text{ms}}}{I_{SC}(\text{gemessen})}$$

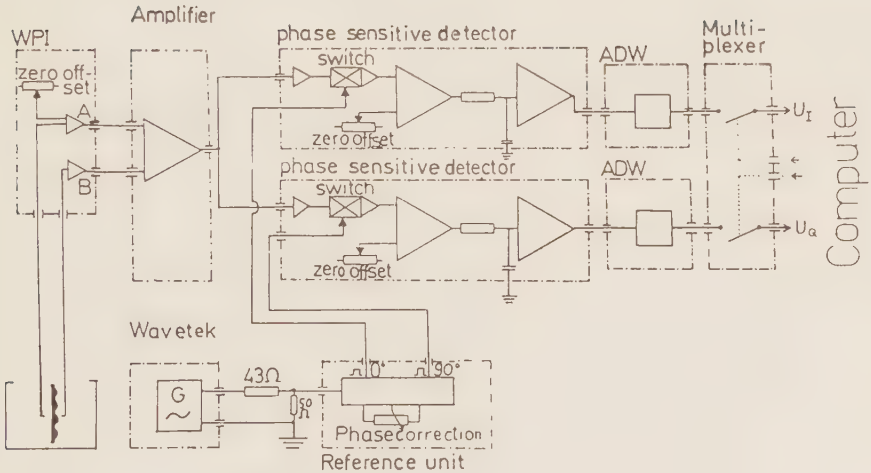
ψ^{ms} = transepitheliale elektrische Spannung unter "open circuit" - Bedingungen.

3.6.9 Messung der Wechselspannung (vgl. Abb. 6)

An die Messung der Wechselspannung wurde die Anforderung gestellt, eine möglichst große Rauschunterdrückung zu gewährleisten - damit bei möglichst kleiner Stromdichte gemessen werden konnte - und außerdem neben dem Betrag der Spannungsantwort auch ihre Phasenlage relativ zum Strom zu bestimmen. Diese Anforderungen erfüllt ein "Lock - in" - Verstärker, d.h. ein von der verwendeten Meßfrequenz gesteuerter und nur für diese empfindlicher Verstärker.

Für die Messung der Wechselspannung in den vorliegenden Experimenten wurde ein ORTEC - "Lock - in"-System aus 4 Komponenten benutzt. Die beiden "Lock - in" - Verstärker (phase sensitive detectors) mit "Nullabgleich" ("zero offset") der Ausgangsgleichspannungen (Funktion des "Nullabgleich" ist unter 3.7.1 beschrieben) gaben ihre Ausgangsspannungen auf zwei Analog - Digital - Wandler (ADW). Die Eingangswechselspannungen wurden von einem Wechselstromdifferenzverstärker ("Amplifier") geliefert, der die Spannungsdifferenz der Ausgänge A und B des Spannungsverstärkers (WPI) vorverstärkte. Die Referenzspannungen lieferte eine vom Frequenzgenerator (Wave-tec) gesteuerte Referenzeinheit (Reference unit) in Form von zwei um 90° phasenverschobenen Rechteckspannungen, die gemeinsam bei fester Kopplung mit der "Phasenkorrektur" (Abb. 6) um $0 - 360^\circ$ phasenverschoben werden konnten (Funktion der "Phasenkorrektur" ist unter 3.7.3 beschrieben).

Abb. 6 Messung der Wechselspannung



Die verwendeten Geräte sind mit ihren Herstellern und Spezifikationen im "Verzeichnis der verwendeten Geräte" unter 3.6.10 aufgeführt. Die Funktion der Geräte ist unter 3.6.9 beschrieben.

3.6.10 Verzeichnis der verwendeten Geräte und Hersteller (H)
(zu Abb. 4, 5 und 6)

- 1) Wavetek: Sinusstromgenerator "Wavetek Model 131A"; H: Wavetek, Indianapolis, USA.
- 2) Strom/Spannungswandler: Strom/Spannungswandler; H: Eigenbau (2) mit Verstärkerbaustein "Model 1027" der Fa. Teledyne, Philbrick.
- 3) Digitalmultimeter PM 2421: Digitalmultimeter "PM 2421"; H: Philips Eindhoven, Niederlande
- 4) ADW: Analog - Digital - Wandler "ADC 6001"; H: Euratron GmbH, Berlin.
- 5) Multiplexer: Interface; H: Euratron GmbH, Berlin.
- 6) WPI: Spannungsverstärker " Model 223A" Eingang: $10^{15} \Omega$
H: WP Instruments, Hamden, CT, USA.
- 7) U - clamp: Voltage - clamp - Gerät; H: Eigenbau des Physiologischen Labors der Katholischen Universität, Leuven, Belgien.
- 8) Amplifier: Differenzverstärker "Ortec differential ac amplifier 9454"; H: Brookdeal Electronics Ltd., Bracknell, GB.
- 9) Phasesensitive detectors: "Lock - in" - Verstärker "ortec phase sensitive detector 9412A", Eingang: $470 \text{ k}\Omega$, 100 pF
H: Brookdeal Electronics Ltd., Bracknell, GB.

- 10) Reference unit: Referenzeinheit "reference unit 9422"; H: Brookdeal Electronics Ltd., Bracknell, GB.
- 11) in Abb. 4 - 6
nicht eingetragen:
Frequenzmeßgerät "Philips universal counter"; H: Philips Eindhoven, Niederlande.
- 12) Datenverarbeitungsgeräte
(unter "Rechner" bzw. "Computer" zusammengefaßt):
- Fernschreiber " Teletype 3902"; H: Teletype Corporation, Skokie, IL, USA.
- Rechner "PDP 8 L" ; H: Digital Equipment, Maynard, MA, USA.
- Rechner "PDP 8 E" ; H: Digital Equipment, Maynard, MA, USA.
- Incremental Plotter "Complot DP-1" H: Houston Instruments, Austin, TX, USA.
- Drucker "DEC Writer 2" ; H: Digital Equipment, Maynard, USA.

3.6.11 Datenverarbeitung im on line-Betrieb

Die Datenverarbeitung der Meßwerte erfolgte mit einem in Fortran 2 programmierten Rechner "PDP 8 L" im on line-Betrieb. Jede einzelne Messung bestand in der Aufnahme einer Datenzeile aus den Meßwerten für:

Stromstärke des Wechselstromes (I) (vgl. 3.6.5)

Frequenz des Wechselstromes (f) (vgl. 3.6.5)

Wechselspannung in phase (U_I) (vgl. 3.6.9)

Wechselspannung 90° gegen Phase ("quadrature")

(U_Q) (vgl. 3.6.9)

Spontane transepitheliale elektrische Spannung

(ψ^{ms}) (vgl. 3.6.6)

Zeit seit Einbringung des Darmstückes in die Meßkammer (t)

Nummer der Datenzeile (N)

Die Meßwerte wurden dabei vom Multiplexer simultan aufgenommen, kurz zwischengespeichert und vom Rechner dort sequentiell abgefragt. Der Rechner war programmiert, alle Meßwerte einer Datenzeile zu speichern, darauf aus I , U_I und U_Q den Real- und Imaginärteil der Impedanz zu errechnen und zu speichern und dann die Datenzeile zusammen mit der Impedanz auf dem Fernschreiber "Teletype 3902" auszudrucken.

Umgekehrt diente der Fernschreiber auch der Übermittlung an den Rechner, z.B. dem Start oder Stop des Programmablaufes oder der Einfügung erläuternder Textzeilen.

3.7 Ablauf des in vitro - Versuches

3.7.1 Nullabgleich der Meßgeräte

Nach Füllung der Meßkammer allein mit Lösung und ohne Anlegen eines Stromes wurden folgende Abgleiche vorgenommen:

Zunächst wurde die Spannung am Ausgang der Analog - Digital - Wandler für die "in phase" - Spannung (U_I) und die "in quadrature" - Spannung (U_Q) mit dem Nullabgleich ("zero offset", vgl. Abb. 6) der "Lock - in" - Verstärker auf Null abgeglichen. Dann wurde die Spannung am Ausgang des Analog - Digital - Wandlers der spontanen transepithelialen elektrischen Spannung (Ψ^{ms}) mit dem Nullabgleich ("zero offset", vgl. Abb. 5) des Spannungsverstärkers "Modell 223A" auf Null abgeglichen.

3.7.2 Messung des Badwiderstandes

Der Badwiderstand (R_{Bad}) ist der Widerstand, den die nur mit der Versuchslösung gefüllte Kammer besitzt. Der Badwiderstand wurde jedesmal aktuell mit einem Wechselstrom der Referenzfrequenz 103 Hz (vgl. 3.7.3) gemessen. Dieser gemessene Wert wurde später automatisch von jedem gemessenen Widerstand subtrahiert. Im Mittel betrug der Badwiderstand $54 \Omega \cdot cm^2$. Bei einem Abstand der Spannungselektroden von 8 mm betrug die spez. Volumenleitfähigkeit der Lösung damit bei $37^\circ C$ $14,8 ms \cdot cm^{-1}$.

3.7.3 Korrekturen

Die Korrekturen beruhten darauf, daß ein rein ohm'scher Leiter im gesamten Frequenzbereich einen konstanten Widerstand ohne Phasenverschiebung zwischen Strom und Spannung besitzt. Die Korrekturen mußten also erreichen, daß sich die Meßapparatur, solange sich keine impedanzbehaftete Membran in der Kammer befand, frequenzunabhängig verhielt. Unter der Annahme, daß die Meßkammer zusammen mit den Verstärkern ein lineares Element bildet, gilt dann, daß das tatsächliche Impedanzverhalten der mit einer ohm'schen Membran beschickten Kammer auf das einer idealen frequenzunabhängigen ohm'schen Kammer durch Multiplikation mit einem Korrekturfaktor korrigiert werden kann.

Im weiteren Ablauf des Versuches wurde nun als "rein ohm'sche" Membran ein mit 3 Stichen einer Kanüle Nr.1 perforiertes Stück Parafilm " M " (American company, Neenah, WI, USA) in die Meßkammer eingespannt und ein Wechselstrom der Referenzfrequenz 103 Hz ⁺ angelegt. Nun wurde die Phasenlage der beiden Rechteckspannungen am Ausgang der Referenzeinheit (reference unit 9422, Abb. 6) gleichsinnig unter fester Kopplung mit der Phasenkorrektur (Phase correction,

⁺ Die Frequenz von etwa 100 Hz wurde als Referenzfrequenz gewählt, weil das Eigenimpedanzverhalten der Meßapparatur im Bereich von 10 - 1000 Hz annähernd frequenzunabhängig war. Um eine Störung durch Oberwellen der Netzfrequenz zu vermeiden, wurde als Referenzfrequenz nicht 100 Hz, sondern 103 Hz benutzt.

Abb. 6) solange modifiziert, bis die Spannung am Ausgang des Analog - Digital - Wandlers der "in quadrature" - Spannung (U_Q) wieder auf Null abgeglichen war. Unter diesen Bedingungen wurde nun eine Datenzeile aufgenommen mit folgenden Meßwerten:

IR: Stromstärke bei der Referenzfrequenz (R)
R: Referenzfrequenz 103 Hz
 U_I R: Spannung "in phase" bei der Referenzfrequenz (R)
 U_Q R: Spannung "in quadrature" bei der Referenzfrequenz (R) (per definitionem hier Null)
 ψ^{ms} : auf Null abgeglichen

Ohne jetzt noch einmal eine Einstellung an den Meßinstrumenten zu verändern, wurde sodann an dem perforierten Parafilmstück eine Serie von Datenzeilen (K - Block) mit aufsteigenden Frequenzen von z.B. 3 Hz, 10 Hz, 20 Hz, 40 Hz, 80 Hz, 150 Hz, 300 Hz, 500 Hz, 1 kHz, 2 kHz, 4 kHz, 10 kHz aufgenommen. Mit diesen Datenzeilen wurden nun die Korrekturfaktoren für die jeweiligen Meßfrequenzen des K - Blocks berechnet und abgespeichert.

Korrekturfaktor des Stromes (KI)

Der Korrekturfaktor des Stromes bei der Frequenz (f) entspricht dem Verhältnis des Stromes bei der Referenzfrequenz (R) zu dem Strom bei der Frequenz (f).

$$(1) \quad KI(f) = \frac{I(R)}{I(f)}$$

KI (f) : Korrekturfaktor des Stromes bei der Meßfrequenz (f)

I (R) : Stromstärke bei der Referenzfrequenz (R)

I (f) : Stromstärke bei der Meßfrequenz (f)

R: Referenzfrequenz 103 Hz
f: aktuelle Meßfrequenz im "K - Block"

Korrekturfaktor der Spannung

Der Korrekturfaktor der Spannung ist eine komplexe Größe. Bei der Frequenz (f) entspricht der Korrekturfaktor dem Verhältnis der Spannung bei der Referenzfrequenz (R) zu der Spannung bei der Frequenz (f).

$$(2) \quad KU(f) = \frac{U_I(R) + j \cdot U_Q(R)}{U_I(f) + j \cdot U_Q(f)}$$

KU (f) : Korrekturfaktor der Spannung bei der Meßfrequenz (f)

$U_I(R)$: Spannung "in phase" bei der Referenzfrequenz (R)

$U_Q(R)$: Spannung "in quadrature" bei der Referenzfrequenz (R)

$U_I(f)$: Spannung "in phase" bei der Meßfrequenz (f)

$U_Q(f)$: Spannung "in quadrature" bei der Meßfrequenz (f)

R : Referenzfrequenz 103 Hz

f : aktuelle Meßfrequenz im "K - Block"

j : $\sqrt{-1}$

Korrekturfaktoren für Messungen bei Frequenzen zwischen denen des "K - Blocks" wurden durch lineare Interpolation aus den Gleichungen (1) und (2) abgeleitet.

$$(3) \quad K(f_3) = K(f_1) + \frac{f_3 - f_1}{f_2 - f_1} \cdot [K(f_2) - K(f_1)]$$

- $K(f_3)$: Korrekturfaktor bei einer Zwischenfrequenz (f_3)
 $K(f_1)$: Korrekturfaktor bei der nächstgelegenen tieferen Frequenz (f_1)
 $K(f_2)$: Korrekturfaktor bei der nächstgelegenen höheren Frequenz (f_2)
 f_3 : Zwischenfrequenz zwischen zwei Meßfrequenzen des "K - Blocks"
 f_1 : zur Frequenz f_3 nächstgelegene tiefere Frequenz im "K - Block"
 f_2 : zur Frequenz f_3 nächstgelegene höhere Frequenz im "K - Block"

Jede, während der eigentlichen Experimente am Epithel gemessene Stromstärke oder Spannung wurde vom Rechner mit Hilfe der abgespeicherten oder interpolierten Korrekturfaktoren automatisch folgendermaßen korrigiert:

Korrektur einer Stromstärke

$$(4) \quad I(\text{korrigiert})(f) = I(\text{gemessen})(f) \cdot KI(f)$$

$I(\text{korrigiert})(f)$: korrigierte Stromstärke bei der Meßfrequenz (f)

$I(\text{gemessen})(f)$: gemessene Stromstärke bei der Meßfrequenz (f)

$KI(f)$: Korrekturfaktor der Stromstärke für die Meßfrequenz (f)

f : aktuelle Meßfrequenz

Korrektur einer Spannung

(5)

$$U_I(k)(f) + j \cdot U_Q(k)(f) = \left[U_I(g)(f) + j \cdot U_Q(g)(f) \right] \cdot KU(f)$$

- $U_I(k)(f)$: korrigierte Spannung "in phase" bei der Meßfrequenz (f)
 $U_Q(k)(f)$: korrigierte Spannung "in quadrature" bei der Meßfrequenz (f)
 $U_I(g)(f)$: gemessene Spannung "in phase" bei der Meßfrequenz (f)
 $U_Q(g)(f)$: gemessene Spannung "in quadrature" bei der Meßfrequenz (f)
 $KU(f)$: Korrekturfaktor der Spannung für die Meßfrequenz (f)
 f : aktuelle Meßfrequenz
 j : $\sqrt{-1}$

3.7.4 Messung am Epithel

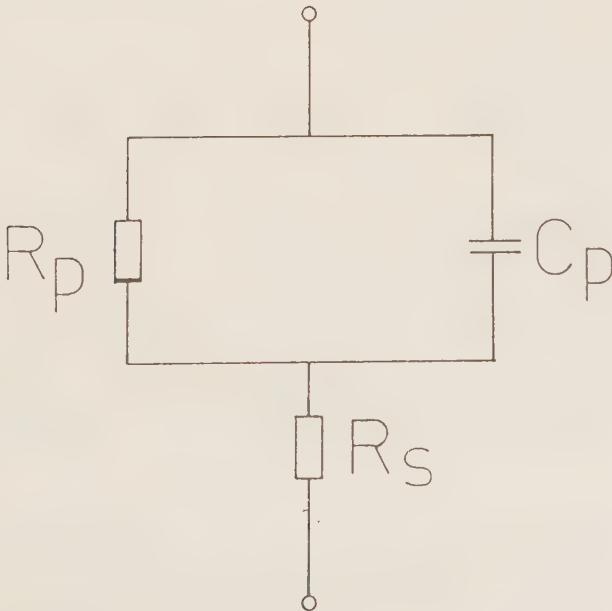
Die Messung am Epithel gliederte sich in mehrere Meßblöcke mit einer Dauer von jeweils etwa 10 min. In jedem Meßblock wurden zunächst mehrere Datenzeilen im Abstand von etwa 20 sek bei einer Meßfrequenz von 3 Hz aufgenommen. Darauf wurde der Kurzschlußstrom (I_{SC}) gemessen. Dann erfolgte die Aufnahme einer Serie von Datenzeilen bei aufsteigenden Meßfrequenzen von z.B. 3 Hz, 10 Hz, 20 Hz, 40 Hz, 80 Hz, 150 Hz, 300 Hz, 500 Hz, 1 kHz, 2 kHz, 4 kHz, 10 kHz. Aus diesen Meßpunkten entsteht bei Auftragung in der komplexen Ebene⁺ eine Ortskurve der Impedanz des gemessenen Epithels (vgl. Abb. 11 und 12). Nun wurde nochmals der Kurzschlußstrom gemessen und danach wurden wiederum einige Datenzeilen bei 3 Hz aufgenommen.

⁺ Diese Auftragung der Ortskurve der Impedanz in der komplexen Ebene (Auftragung von Z "in quadrature" gegen Z "in phase") wird als "Cole plot" (7) bezeichnet.

3.7.5 Auswertung der Impedanzkurven

Bei der Messung der Impedanz des Dickdarmepithels der Ratte ergaben sich in den hier vorgestellten Experimenten Ortskurven mit der Form eines Halbkreises im 4. Quadranten des Cartesischen Koordinatensystems (vgl. Abb.8). Die einfachste elektrische Schaltung mit demselben Impedanzverhalten, die deshalb auch als ein dem Dickdarmepithel der Ratte elektrisch annähernd äquivalenter Schaltkreis ("Ersatzschaltung") angesehen werden kann, zeigt Abb. 7 :

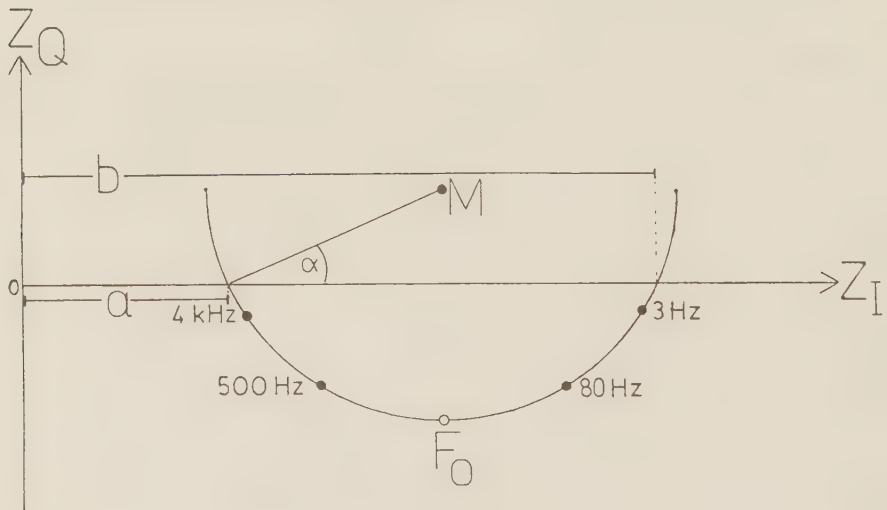
Abb. 7 Elektrische Ersatzschaltung für das Dickdarmepithel der Ratte



C_p : parallele Kapazität
 R_p : paralleler Widerstand
 R_s : Widerstand in Serie

Die Abb. 8 zeigt das Schema einer Ortskurve der Impedanz in der komplexen Ebene, wie sie am Dickdarm der Ratte erhoben wurde.

Abb. 8 Schematische Ortskurve der Impedanz des Dickdarmepithels der Ratte in der komplexen Ebene



Halbkreisparameter

a : Realteil der Impedanz bei der Meßfrequenz ∞ Hz
 b : Realteil der Impedanz bei der Meßfrequenz 0 Hz
 M : Mittelpunkt des Halbkreises

- α : Mittelpunktshub des Halbkreises in Grad (α wäre Null und damit läge M auf der reellen Achse, wenn die Impedanzmessung an einer Schaltung wie der in Abb. 7 erfolgte)
- F_0 : Charakteristische Frequenz . Dies ist die Meßfrequenz mit dem größten negativen Imaginärteil (Z_Q). Dabei halbiert die Strecke $\overline{F_0 M}$ die Strecke $b - a$.
- Z_I : Realteil der Impedanz in $\Omega \cdot \text{cm}^2$ (Z "in phase")
- Z_Q : Imaginärteil der Impedanz in $\Omega \cdot \text{cm}^2$ (Z "in quadrature")
- : Impedanzpunkte in der komplexen Ebene bei der jeweiligen Meßfrequenz

Aus den Halbkreisparametern der Ortskurve der Impedanz (vgl. Abb. 8) des Dickdarmepithels der Ratte lassen sich nun die drei Größen C_p , R_p und R_s der elektrischen Ersatzschaltung ableiten. Da der Widerstand des Kondensators mit $R_C = \frac{1}{2\pi \cdot f \cdot C}$ bei hohen Meßfrequenzen gegen Null strebt, nähert sich bei hohen Meßfrequenzen ($f \rightarrow \infty$) der Gesamtwiderstand der Ersatzschaltung dem Serienwiderstand (R_s). Umgekehrt nähert sich bei niedrigen Meßfrequenzen ($f \rightarrow 0$) der Gesamtwiderstand der Ersatzschaltung $R_s + R_p$, da für $f \rightarrow 0$ der Widerstand des Kondensators gegen ∞ strebt. Für die charakteristische Frequenz (F_0) gilt $R_p = R_C$, wobei R_C den Widerstand des parallelen Kondensators (C_p) bezeichnet, und damit errechnet sich die Kapazität des parallelen Kondensators nach:

$$C_p = \frac{1}{2\pi \cdot F_0 \cdot R_p}$$

Die Errechnung von R_p und R_s aus den Halbkreisparametern erfolgt nach:

$R_s = a$ und $R_p = b - a \cdot R_{total} (R_t)$ ist der Widerstand unter Gleichstrombedingungen ($R_t = R_p + R_s$) und wurde nach $R_t = b$ bestimmt.

Im Rahmen jedes Meßblockes wurde nun eine Serie von Datenzeilen mit aufsteigenden Meßfrequenzen zwischen 3 Hz und 10 kHz⁺ aufgenommen. Mit dem Fernschreiber (Teletype 3902) konnten diese Datenzeilen sofort ausgedruckt werden.

3.7.6 Versuchsauswertung im off line-Betrieb

Alle im Rechner "PDP 8L" gespeicherten Daten, bestehend aus den Datenzeilen des Korrekturblockes sowie den Datenzeilen der Meßblöcke, wurden auf einen Rechner "PDP 8E" übertragen. Entsprechend der Interpretation der am Epithel gemessenen Impedanzkurve als Ortskurve eines RC - Gliedes (Abb. 7) wurde an die Meßpunkte ein Halbkreis nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate angepaßt. Diese Anpassung und die Berechnung von R_p , R_s und C_p erfolgte durch den Rechner "PDP 8E" im Rahmen eines sog. "Kreis fit" - Programmes im off line-Betrieb. Dieser druckte dann alle Datenzeilen auf einem Drucker ("DEC Writer 2")

⁺ Eine Frequenz von 3 Hz wurde als unterste Meßfrequenz gewählt, weil die Meßdauer bei der "Lock - in" - Technik bei tiefen Meßfrequenzen stark ansteigt und dann die biologische Konstanz der Meßdaten während einer Frequenzserie zum Problem wird. Eine Frequenz von 10 kHz war als oberste Meßfrequenz im Hinblick auf die beobachteten Zeitkonstanten hinreichend groß.

aus und gab zusätzlich auf einem "Incremental Plotter" ("Complot DP - 1") die Impedanzwerte zusammen mit den berechneten Ortskurven als Diagramm aus. Schließlich wurden R_t , R_p , R_s , C_p , α und Ψ^{ms} als Funktion der Zeit aufgetragen.

3.8 Versuchsablauf

3.8.1 Vergleich des intakten und gestrippten Rectum

Die Ratten (vgl. 3.1.1, Kollektive 1 und 2) wurden narkotisiert (vgl. 3.3) und unmittelbar nach Eintritt der Anaesthetie die Peritonealhöhle entlang der Linea alba eröffnet. Anschließend wurde das proximale T - Stück (vgl. 3.4.1) etwa 5 cm proximal des Anus in den Dickdarm der Ratte eingebunden und die distalen 5 cm des Dickdarmes mit 50 ml einer 37°C warmen Versuchslösung von Scybala freigespült. Darauf wurde das distale T - Stück in den Anus der Ratte eingebunden und der Perfusionskreislauf angeschlossen (vgl. 3.4.1).

Nun wurde im Durchschnitt etwa über 7 Stunden die spontane transepitheliale elektrische Spannung (Ψ^{ms}) des Rectum in vivo kontinuierlich gemessen. Dabei stieg Ψ^{ms} während der gesamten Versuchsdauer langsam kontinuierlich an. Der letzte und damit auch der höchste Wert von Ψ^{ms} vor Entnahme des Darmstückes zur in vitro - Messung wurde als Ψ_{max}^{ms} bezeichnet.

Dann wurde ein Darmstück für die in vitro - Messung entnommen, indem der Darm proximal an der Einbindestelle des proximalen T - Stückes (5 cm proximal des Anus) und distal soweit innerhalb der

Bauchhöhle eben noch erreichbar (etwa 2,5 cm proximal des Anus) abgesetzt wurde⁺. Das Darmstück wurde dann entlang der Mesenterialwurzel aufgeschnitten und für das Kollektiv 1 intakt belassen, während es für das Kollektiv 2 gestrippt wurde (vgl. 3.5).

Anschließend wurde das Darmstück flach auf eine Präparierplatte aus Siliconkautschuk gelegt und unter leichter Dehnung (ca. auf das 1,5fache in der Lineardimension gegenüber dem Ruhedehnungszustand) mit Nadeln am Rand auf der Unterlage angeheftet. Darauf wurde der Nadelkranz des Epithelcontainers (vgl. 3.6.2) auf das Darmstück aufgedrückt, der überstehende Epithelrand mit einem Skalpell abgetrennt, der Epithelcontainer zusammengesetzt und in die Kammer montiert. Sofort wurde die Kammer (vgl. 3.6.1) mit 37°C warmer Versuchslösung (vgl. 3.10) gefüllt.

Der Zeitpunkt der Füllung der Meßkammer mit der Versuchslösung wurde als Nullpunkt für die Zeitnahme beim in vitro - Versuch definiert. Die Präparationszeit vom Unterbrechen der Blutversorgung durch Entnahme des Darmstückes aus der Bauchhöhle bis zur Füllung der Meßkammer mit Lösung betrug im Kollektiv 1 etwa 5 min und im Kollektiv 2 etwa 15 min (vgl. 3.5). Die Zeit vom Beginn der Narkose bis zum Füllen der Meßkammer mit Lösung betrug im Durchschnitt im Kollektiv 1 $7,38 \pm 0,25$ Stunden ($n = 15$) und im Kollektiv 2 $6,82 \pm 0,44$ Stunden ($n = 18$).

Nun wurde jeweils in vitro im Rahmen von 4 Meßblöcken über eine Dauer von 40 min der Kurzschlußstrom, die

⁺ Zur genauen Lokalisation vgl. 3.1.1

spontane transepitheliale elektrische Spannung und die Impedanz gemessen. Die spontane transepitheliale elektrische Spannung (Ψ^{ms}) nahm in vitro kontinuierlich ab. Der erste und damit größte Wert für Ψ^{ms} in vitro wurde als $\Psi^{ms}_{initial}$ bezeichnet.

Um Aufschluß über die Funktionserhaltungszeit des gestrippten Epithels zu gewinnen wurde bei 6 Versuchen in Kollektiv 2 insgesamt über eine Dauer von 100 min gemessen.

3.8.2 Segmentale Unterschiede einiger elektrophysiologischer Eigenschaften des Dickdarmepithels

Die Ratten wurden narkotisiert (vgl. 3.3) und die Bauchhöhle entlang der Linea alba eröffnet. Die Darmstücke aus dem Rectum (Kollektiv 2 - identisch mit dem unter 3.8.1 beschriebenen) wurden, wie unter 3.8.1 beschrieben, behandelt. Die Darmstücke aus dem Colon descendens (Kollektiv 3) und dem Colon ascendens (Kollektiv 4) wurden nach Einbinden eines Schlauches unmittelbar distal des Caecum mit 50 ml 37°C warmer Versuchslösung freigespült und sofort danach für den in vitro - Versuch entnommen. Alle Darmstücke wurden gestrippt (vgl. 3.5) und, wie in 3.8.1 beschrieben, in die Kammer eingesetzt. Die Präparationszeit vom Unterbrechen der Blutzufuhr bis zum Füllen der Meßkammer mit Lösung betrug im Kollektiv 3 und 4 (wie auch im Kollektiv 2) 15 min . Die Zeit vom Beginn der Narkose bis zum Füllen der Kammer mit Lösung betrug im Kollektiv 3 und 4 etwa 30 min (im Kollektiv 2 $6,82 \pm 0,44$ Stunden). Nun wurde jeweils in vitro über eine Dauer von 40 min die spontane transepitheliale elektrische Spannung und die Impedanz gemessen.

3.9 Histologie und Morphometrie des Dickdarmes der Ratte

3.9.1 Histologische Aufarbeitung der Darmstücke

Für die morphologischen Untersuchungen wurde bei 7 narkotisierten Ratten die Bauchhöhle eröffnet und der ganze Dickdarm zwischen Caecum und Anus für die Dauer einer Stunde an die Perfusionsanordnung (vgl. 3.4.1) angeschlossen. Anschließend wurden jeder Ratte 3 Darmstücke aus dem Rectum (für Kollektive 5 und 6), dem Colon descendens (für das Kollektiv 7) und dem Colon ascendens (für das Kollektiv 8) entnommen. Für die genaue Lokalisation der Darmstücke der Kollektive 5 - 8 vgl. 3.1.1 .

Das Darmstück aus dem Rectum wurde nun der Länge nach halbiert und die eine Hälfte gestriipt (für das Kollektiv 6), die andere Hälfte intakt belassen (für das Kollektiv 5). Die Darmstücke aus dem Colon descendens und Colon ascendens wurden alle gestriipt.

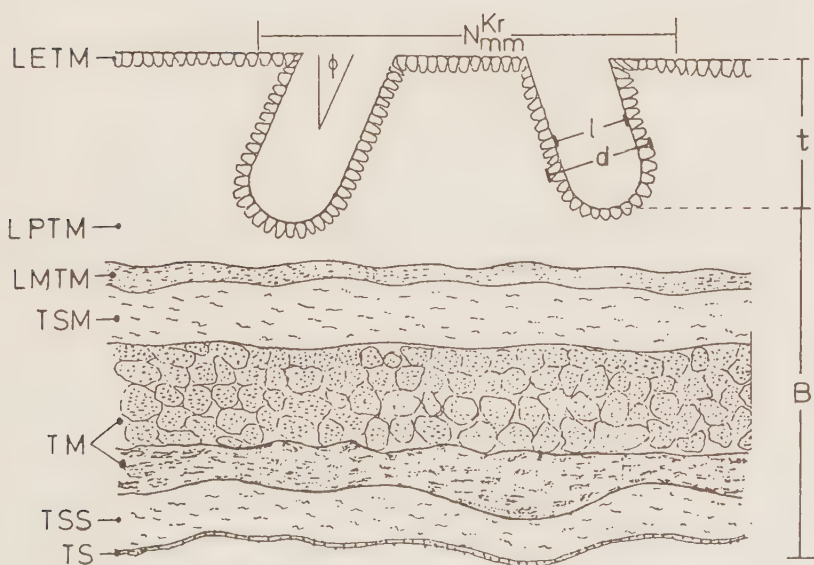
Zur Fixierung wurden nun alle Darmstücke auf der Präparierplatte aus Siliconkautschuk (vgl. 3.8.1) unter vergleichbarer Spannung, wie oben für das Einspannen in den Container beschrieben, ausgespannt und mit Nadeln am Rand angeheftet. Die Darmstücke wurden nun mit 10%igem Formalin über 30 min in dieser Lage fixiert. Dadurch sollte ein der elektrischen Messung vergleichbarer Dehnungszustand gewährleistet werden. Später wurden die Darmstücke in Paraffin eingebettet, mit einem Mikrotom in der Schichtdicke 10 μ m geschnitten und in H.E. gefärbt. Die Morphometrie der Darmstücke erfolgte mit einem Mikroskop Leitz Dialux und einem Okular mit einem Fadenmikrometer bei den Vergrößerungen 960 fach, 600 fach und 360 fach.

Für die Morphometrie wurden von den 7 Ratten jeweils 4 Schnitte angefertigt. Je einer aus dem intakten und gestrippten Rectum, einer aus dem gestrippten Colon descendens und einer aus dem gestrippten Colon ascendens.

3.9.2 Morphometrie der Darmstücke

Die Abb. 9 ist ein schematischer Schnitt durch den Dickdarm der Ratte und zeigt die im Rahmen der Morphometrie erhobenen Meßgrößen :

Abb. 9 Schematischer Schnitt durch den Dickdarm der Ratte



LETM : Lamina epithelialis tunicae mucosae

LPTM : Lamina propria tunicae mucosae

LTM : Lamina muscularis tunicae mucosae
TSM : Tela submucosa
TM : Tunica muscularis
TSS : Tela subserosa
TS : Tunica serosa

N_{mm}^{Kr} : Zahl der Krypten pro 1 mm Oberflächenlänge, die im Schnitt von 10 μ m Schnittiefe angeschnitten waren.
t : Tiefe der Krypten. Gemessen wurde, ohne Rücksicht auf den Neigungswinkel der Krypten, vom Grund der Krypte senkrecht zur Oberfläche.
 Φ : Neigungswinkel der Krypte zur Senkrechten auf die Oberfläche (optisch geschätzt).
d : Durchmesser der Krypten außen⁺.
l : Durchmesser des Lumens der Krypten⁺.
B : Schichtdicke des subepithelialen Gewebes (unterhalb des Kriptenbodens gemessen).

Die Größen N_{mm}^{Kr} , t, Φ , d und l wurden in jedem Schnitt an 5 verschiedenen Orten gemessen und daraus der Mittelwert gebildet. Aus diesen Mittelwerten wurde dann für jeden Schnitt der Wert für OF und N_{mm}^{Kr2} ausgewertet.

Zahl der Krypten pro 1 mm² Oberfläche (N_{mm}^{Kr2})

Die Schnittstärke des Mikrotoms betrug 10 μ m . Die Zahl

⁺ Für das Ausmessen von d und l wurden jeweils die breitesten Krypten im Schnitt ausgewählt, damit die Kryptendurchmesser zentral und nicht an einer Sekante gemessen wurden.

der Krypten, die auf einer Oberflächenlänge von 1 mm erkennbar an die Oberfläche mündeten, betrug dabei $N_{\text{mm}}^{\text{Kr}}$. Die Zahl der Krypten pro 1 mm² Oberfläche ergab sich damit durch Summation der Krypten, die in 100 Schnitten gezählt wurden, unter der Voraussetzung, daß jede Krypte nur in jeweils einem Schnitt gezählt wurde. Da aber der äußere Kryptendurchmesser (d) mit etwa 50 μm im Verhältnis zur Schnittstärke von 10 μm relativ groß war, wurde jede Krypte im Mittel $\frac{d + 5 \mu\text{m}}{10 \mu\text{m}}$ mal angeschnitten (vgl. 5.7).

Oberflächenfaktor (OF) der Epithelfläche

Die makroskopisch sichtbare Darmwandfläche (F_{makro}) wird einfach am flach ausgebreiteten Darmstück gemessen und berücksichtigt keine oberflächenvergrößernden Strukturen. Die Epithelfläche (F_{Epithel}) ist die mikroskopisch sichtbare Darmwandfläche und berücksichtigt die Oberflächenvergrößerung durch die Krypten. Die wahre luminale Membranoberfläche ($F_{\text{lum Mem}}$) unter Berücksichtigung der Mikrovilli ist nur einer elektronenmikroskopischen Betrachtung zugänglich.

Die Epithelfläche (F_{Epithel}) einer Darmwandfläche (F_{makro}) ergibt sich durch Addition der Oberfläche aller Krypten (F_{Kr}) auf dieser Darmwandfläche

+ Eine Krypte ist dann auf einem 10 μm starken Schnitt erkennbar, wenn die Krypte mindestens ein Viertel (also 2,5 μm) oder mehr von der Schnittstärke einnimmt. Deshalb beträgt die Zahl der Schnitte, in denen dieselbe Krypte erkennbar ist, bei einer Schnittstärke von 10 μm und einer Kryptendicke von (d) : $\frac{d + 5 \mu\text{m}}{10 \mu\text{m}}$.

zur Darmwandfläche (F_{makro}) :

$$F_{\text{Epithel}} = F_{\text{makro}} + F_{\text{Kr}}$$

Die Oberfläche aller Krypten (F_{Kr}) der Darmwandfläche (F_{makro}) beträgt :

$$F_{\text{Kr}} = N_{F_{\text{makro}}}^{\text{Kr}} \cdot \pi \cdot l \cdot \frac{t}{\cos \varphi}$$

Dabei ist $N_{F_{\text{makro}}}^{\text{Kr}}$ die Zahl aller Krypten auf der Darmwandfläche (F_{makro}) und zu l , t und φ vgl. Abb. 9 . Der Oberflächenfaktor (OF) ist der Faktor, mit dem die makroskopische Darmwandfläche (F_{makro}) multipliziert werden muß, um die zu ihr gehörige Epithelfläche (F_{Epithel}) zu erhalten :

$$\text{OF} = \frac{F_{\text{Epithel}}}{F_{\text{makro}}}$$

3.10 Lösungen

Für die Versuche wurden zu verschiedenen Zeiten verschiedene Lösungen (vgl. Tab. 3) benutzt : Für die zunächst untersuchten Kollektive 3 und 4 die Lösung 1, für alle anderen Kollektive die Lösung 2 .

Im Unterschied zu Lösung 1 war Lösung 2 nicht durch Lactat, Imidazol und Bicarbonat, sondern durch Hydrogenphosphat, Glutamin und Bicarbonat gepuffert. Als Substrat enthielt die Lösung 1 Acetat, Lactat und Glucose, die Lösung 2 dagegen β -OH-Butyrat, Glutamin, Mannose und Glukose. Die Konzentrationen von NaCl, KCl, MgCl_2 und CaCl_2 waren in beiden Lösungen gleich.

Im Rahmen der Experimente der vorliegenden Arbeit konnte kein Einfluß der unterschiedlichen Lösungszusammensetzung beobachtet werden.

Tab. 3 Zusammensetzung der Versuchslösungen 1 und 2

	Lösung 1	Lösung 2
Herkunft des Rezeptes	eigenes Rezept	Windmüller & Späth (55)
<u>Zusammensetzung</u> in mmol · kg ⁻¹	NaCl 113,6 KCl 5,4 CaCl ₂ 1,2 MgCl ₂ 1,2 NaHCO ₃ 30,0 Glucose 30,0 NaAcetat 2,7 NaLactat 2,7 Milchsäure 2,7 Imidazol 10,0	NaCl 113,6 KCl 5,4 CaCl ₂ 1,2 MgCl ₂ 1,2 NaHCO ₃ 21,0 Glucose 10,0 NaH ₂ PO ₄ 0,6 Na ₂ HPO ₄ 2,4 β-OH-Butyrat 0,5 Glutamin 2,5 Mannose 10,0
Begasung	95Vol%O ₂ + 5Vol%CO ₂	95Vol%O ₂ + 5Vol%CO ₂
pH (gemessen) bei 25°C	7,32	7,39
erechnete Osmolalität	358,7 mosmol · kg ⁻¹	328,2 mosmol · kg ⁻¹
gemessene Osmolalität	302 mosmol · kg ⁻¹	290 mosmol · kg ⁻¹
<u>gemessene Osmol.</u> <u>errechnete Osmol.</u>	0,84	0,88

3.11 Statistische Methoden

Die Auswertung der Experimente erfolgte durch den Vergleich der Versuchskollektive untereinander mit dem t.- Test. Dazu wurde in jedem Kollektiv für jeden Meßzeitpunkt aus den n Meßwerten der Mittelwert ($\bar{x}$) und der mittlere Fehler des Mittelwertes ($S_{\bar{x}}$) gebildet. Soweit im Text nicht besonders gekennzeichnet, erfolgte der Vergleich zwischen den einzelnen Kollektiven mit dem t - Test für unabhängige Beobachtungen (ungepaarter t - Test). Bei Anwendung des t - Testes für abhängige Beobachtungen (gepaarter t - Test) ist dies bei den Ergebnissen vermerkt.

Bei den Ergebnissen angegeben ist die Größe P, die sich aus der Prüfgröße $\hat{t}$ unter Berücksichtigung der Freiheitsgrade (ν) ableitet. Dabei war die Nullhypothese (H_0)⁺ abzulehnen, wenn $P \leq 0,05$. In diesem Sinne signifikant unterschiedliche Ergebnisse wurden mit dem Symbol * gekennzeichnet.

⁺ H_0 (Nullhypothese) : zwei Stichproben liegen bezüglich ihrer Mittelwerte $\bar{x}_1$ und $\bar{x}_2$ gleiche Grundgesamtheiten zugrunde. Wird die Nullhypothese zugunsten der Alternativhypothese (H_A) abgelehnt, wird damit angenommen, daß den beiden Stichproben bezüglich ihrer Mittelwerte $\bar{x}_1$ und $\bar{x}_2$ verschiedene Grundgesamtheiten zugrunde liegen.

4 Ergebnisse

4.1 Einführung

Im Abschnitt 4.2 (Funktionserhaltungszeit des Rectum in vitro) wurde an 6 gestrippten Darmstücken aus dem Rectum der Kurzschlußstrom in vitro über eine Dauer von 100 min gemessen, um die Funktionserhaltungszeit des gestrippten Darmes in vitro beurteilen zu können.

Im Abschnitt 4.3 (Einfluß des Strippens am Rectum) wird der Kurzschlußstrom (I_{sc}), die spontane trans-epitheliale elektrische Spannung (Ψ^{ms}), der Totalwiderstand (R_t), der Parallelwiderstand (R_p), der Serienwiderstand (R_s), die parallele Kapazität (C_p) und die Lage des Mittelpunktes der Ortskurven der Impedanz (Winkel α) des gestrippten Rectum mit denen des intakten Rectum verglichen.

Im Abschnitt 4.4 (Segmentale Unterschiede einiger elektrophysiologischer Eigenschaften) werden die Parameter Ψ^{ms} , R_t , R_p , R_s und C_p von gestrippten Darmstücken aus dem Rectum, Colon descendens und Colon ascendens verglichen.

Im Abschnitt 4.5 (Histologie des Dickdarmes der Ratte) werden Schnitte eines intakten Darmstückes aus dem Rectum sowie je eines gestrippten Darmstückes aus dem Rectum, Colon descendens und Colon ascendens gezeigt und ihre Histologie miteinander verglichen.

Im Abschnitt 4.6 (Morphometrie am Dickdarm der Ratte) erfolgt der Vergleich der Schichtdicken des subepithelialen Gewebes und der Oberflächenfaktoren der Kollektive 5 - 8 .

Einen Überblick über die Kollektive und die an ihnen untersuchten Parameter gibt Tab. 1 (S. 15).

4.2 Funktionserhaltungszeit des Rectum in vitro

An 6 gestrippten Darmstücken aus dem Rectum von Ratten des Kollektivs 2 (vgl. Tab. 1) wurde der Kurzschlußstrom (I_{sc}) über die sonst eingehaltene Versuchsdauer von 40 min hinaus über insgesamt 100 min registriert. Die Resultate sind in Tab. 4 und Abb. 10 dargestellt.

t	Kurzschlußstrom ($\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$)
6.min	$382 \pm 84,5 \mu A \cdot cm^{-2}$
13.min	$288 \pm 68,5 \mu A \cdot cm^{-2}$
26.min	$205 \pm 47,9 \mu A \cdot cm^{-2}$
35.min	$180 \pm 40,1 \mu A \cdot cm^{-2}$
51.min	$158 \pm 38,4 \mu A \cdot cm^{-2}$
68.min	$149 \pm 39,0 \mu A \cdot cm^{-2}$
80.min	$145 \pm 40,1 \mu A \cdot cm^{-2}$
100.min	$134 \pm 32,8 \mu A \cdot cm^{-2}$

Tab. 4 Kurzschlußstrom des gestrippten Rectum (n = 6)
(Daten der Abb. 10)

t : Zeit in min nach Füllung der Kammer mit Lösung

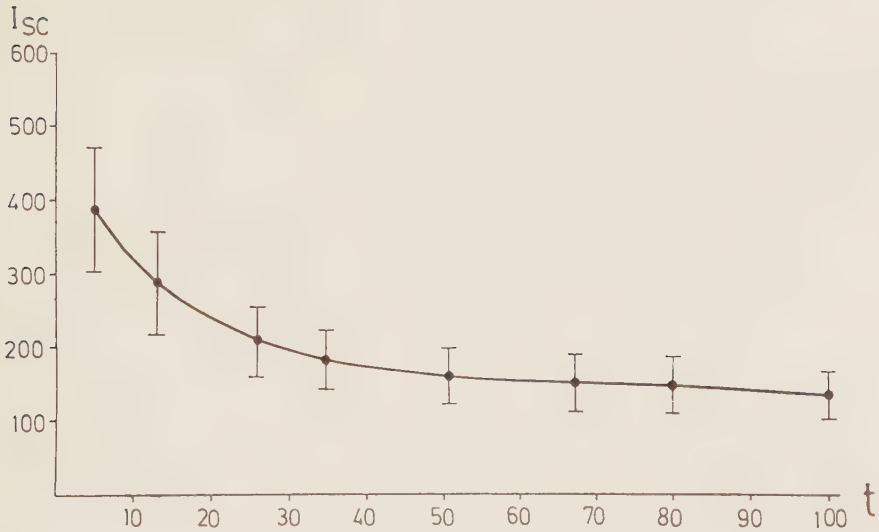


Abb. 10 Kurzschlußstrom des gestrippten Rectum
 (Daten der Tab. 4)

I_{sc} : Kurzschlußstrom in $\mu A \cdot cm^{-2}$ von 6 gestrippten
 Darmstücken aus dem Rectum der Ratte

t : Zeit in min nach Füllung der Kammer mit Lösung

$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$: $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$ von 6 Darmstücken aus Kollektiv 2

Es zeigte sich, daß der Abfall des Kurzschlußstromes in Abb. 10 in logarithmischer Auftragung annäherungsweise durch 2 Geraden mit 2 verschiedenen Zeitkonstanten wiedergegeben werden kann. Für die ersten 30 min des in vitro - Versuches lag die

Abfall - Zeitkonstante etwa bei $0,031 \text{ min}^{-1}$ (≙ einer Halbwertszeit von 22,4 min) , für die letzten 60 min in der Größenordnung von $0,0043 \text{ min}^{-1}$ (≙ einer Halbwertszeit von 161 min) . Die beiden Zeitkonstanten unterschieden sich also etwa um den Faktor 7,2 .

4.3 Einfluß des Strippens am Rectum

Der Einfluß des Strippens am Rectum wurde untersucht, indem die Parameter Ψ^{ms} , I_{sc} , R_t , R_p , R_s , C_p und der Winkel α eines Kollektives von gestrippten Darmstücken aus dem Rectum (Kollektiv 2, vgl. Tab. 1) mit denen eines Kollektives von intakten Darmstücken aus dem Rectum (Kollektiv 1, vgl. Tab. 1) verglichen wurden. Dazu wurden an jedem Darmstück der beiden Kollektive über eine Dauer von 40 min je 4 Meßblöcke aufgenommen (vgl. 3.7.4). Im folgenden sind Originaldaten wiedergegeben, die an einem intakten (Abb. 11) und an einem gestrippten (Abb. 12) Darmstück jeweils im 1. Meßblock (1. - 10. min) erhoben wurden. Die Abb. 11 und 12 zeigen Ortskurven der Impedanz, die mit aufsteigenden Frequenzen zwischen 3 Hz und 4 kHz an einem intakten und einem gestrippten Darmstück aus dem Rectum erhoben wurden :

— : Verbindungslinien zwischen den Meßpunkten der Impedanz; wurden vom Rechner bei vorgegebener Halbkreisform nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate an die Meßpunkte (X) angepaßt.

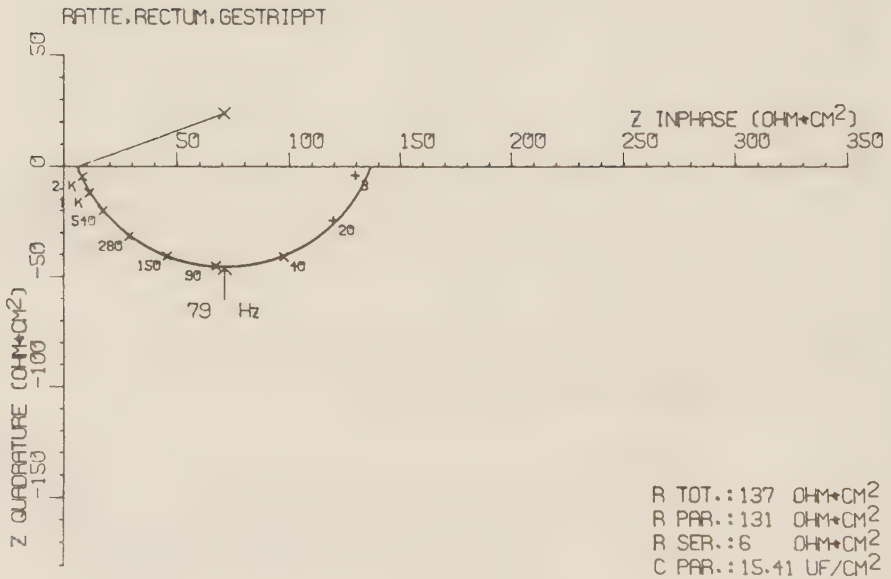


Abb. 12 Originalortskurve der Impedanz eines gestrippten Rectumstückes

Legende wie in Abb. 11

Aus dem Halbkreis wurden dann die Größen R_t , R_p , R_s und C_p , wie unter 3.7.5 beschrieben, errechnet. Die Aufnahme eines Halbkreises dauerte etwa 3 min. Als Meßzeitpunkt des Halbkreises wurde das Mittel der Meßzeiten des ersten und letzten Meßwertes definiert. Der Kurzschlußstrom wurde vor und nach Aufnahme des Halbkreises gemessen und auf den Meßzeitpunkt des Halbkreises interpoliert. Die transepitheliale Spannung (Ψ^{ms}) zum Meßzeitpunkt des Halbkreises wurde aus dem letzten Meßwert für Ψ^{ms} vor und dem ersten Meßwert für Ψ^{ms} nach dem Meßzeitpunkt des Halbkreises durch Interpolation ermittelt.

Aus den n Originalmeßwerten von Ψ^{ms} , I_{sc} , R_t , R_p , R_s , C_p und Winkel α , die an den n Darmstücken eines Kollektivs erhoben wurden, wurde nun für jeden Meßzeitpunkt der Mittelwert und der mittlere Fehler des Mittelwertes gebildet. Die Tab. 5 zeigt die Mittelwerte und mittleren Fehler des Mittelwertes des Kollektiv 1 (Rectum intakt) und die Tab. 6 die des Kollektiv 2 (Rectum gestrippt) über eine Meßdauer von 40 min :

Tab. 5 $\bar{x}$ und $S_{\bar{x}}$ der Meßwerte am intakten Rectum (Kollektiv 1, n = 15)

Meßart	in vivo	in vitro				
Zeit (t_0 = Füllung der Kammer mit Lösung)	t_0 - 5 min	1. min	7. min	14. min	26. min	36. min
$\psi_{\max}^{\text{ms}}$ in mV	$-42,5 \pm 3,01$					
$\psi_{\text{initial}}^{\text{ms}}$ in mV		$-23,8 \pm 1,78$				
ψ^{ms} in mV			$-14,9 \pm 1,98$	$-12,3 \pm 1,91$	$-9,1 \pm 1,55$	$-6,3 \pm 1,27$
I_{sc} in $\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$			$145 \pm 20,1$	$94,1 \pm 15,2$	$64,1 \pm 10,4$	$52,5 \pm 9,53$
R_t in $\Omega \cdot \text{cm}^2$			$124 \pm 7,58$	$152 \pm 11,8$	$172 \pm 15,9$	$164 \pm 17,5$
R_p in $\Omega \cdot \text{cm}^2$			$96,1 \pm 6,74$	$123 \pm 10,7$	$141 \pm 16,6$	$133 \pm 18,9$
R_s in $\Omega \cdot \text{cm}^2$			$25,8 \pm 2,97$	$28,8 \pm 2,83$	$29,7 \pm 3,36$	$30,4 \pm 3,65$
C_p in $\mu\text{F} \cdot \text{cm}^{-2}$			$18,0 \pm 1,82$	$16,5 \pm 1,40$	$14,4 \pm 1,10$	$13,0 \pm 0,96$
Winkel α in Grad			$27,7 \pm 1,21$	$23,7 \pm 0,82$	$22,5 \pm 0,98$	$23,4 \pm 0,96$

Tab. 6 $\bar{x}$ und $S_{\bar{x}}$ der Meßwerte am gestrippten Rectum (Kollektiv 2, n = 18)

Meßart	in vivo	in vitro				
		1. min	7. min	14. min	26. min	36. min
Zeit (t_0 = Füllung der Kammer mit Lösung)	$t_0 - 5 \text{ min}$					
$\psi_{\text{max}}^{\text{ms}}$ in mV	$-48,4 \pm 4,77$					
$\psi_{\text{initial}}^{\text{ms}}$ in mV		$-35,8 \pm 2,35$				
ψ^{ms} in mV			$-30,3 \pm 3,31$	$-24,5 \pm 3,37$	$-17,2 \pm 3,10$	$-13,7 \pm 2,85$
I_{sc} in $\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$			$258 \pm 33,9$	$199 \pm 27,7$	$129 \pm 23,7$	$101 \pm 19,8$
R_t in $\Omega \cdot \text{cm}^2$			$111 \pm 6,96$	$126 \pm 11,0$	$125 \pm 12,6$	$128 \pm 16,0$
R_p in $\Omega \cdot \text{cm}^2$			$101 \pm 6,84$	$115 \pm 11,6$	$116 \pm 13,3$	$118 \pm 16,6$
R_s in $\Omega \cdot \text{cm}^2$			$10,8 \pm 1,33$	$10,4 \pm 1,38$	$9,97 \pm 1,53$	$9,61 \pm 1,57$
C_p in $\mu\text{F} \cdot \text{cm}^{-2}$			$13,8 \pm 1,02$	$13,4 \pm 0,95$	$12,0 \pm 0,79$	$11,0 \pm 0,72$
Winkel α in Grad			$26,4 \pm 2,44$	$22,3 \pm 1,73$	$23,0 \pm 0,99$	$20,2 \pm 0,99$

4.3.1 Einfluß des Strippens auf die spontane transepitheliale elektrische Spannung (Ψ^{ms})

4.3.1.1 Einfluß auf Ψ_{max}^{ms}

Die zuletzt in vivo registrierten und damit höchsten (vgl. 3.8.1) spontanen transepithelialen elektrischen Spannungen (Ψ_{max}^{ms}) des intakten und gestrippten Rectum wurden mit dem t - Test (vgl. 3.11) verglichen :

	intaktes Rectum n = 15	gestripptes Rectum n = 18	P
Ψ_{max}^{ms}	-42,5 ± 3,01 mV	-48,4 ± 4,77 mV	0,33

Tab.7 Vergleich der maximalen spontanen transepithelialen elektrischen Spannungen in vivo (Ψ_{max}^{ms})

Die Daten sind den Übersichtstab. 5 und 6 entnommen.

Ψ_{max}^{ms} des intakten und des gestrippten Rectum waren demnach nicht signifikant verschieden. Damit war die Forderung, daß sich die beiden Versuchskollektive der Darmstücke aus dem intakten und gestrippten Rectum vor Beginn der Stripp - Prozedur nicht unterscheiden sollten, bis hierher erfüllt.

4.3.1.2 Einfluß auf $\Psi_{\text{initial}}^{\text{ms}}$

Die unmittelbar nach Beginn des in vitro-Versuches (1. min) gemessenen spontanen transepithelialen elektrischen Spannungen ($\Psi_{\text{initial}}^{\text{ms}}$) des intakten und des gestrippten Rectum wurden mit dem t - Test (vgl. 3.11) verglichen :

	intaktes Rectum n = 15	gestripptes Rectum n = 18	P
$\Psi_{\text{initial}}^{\text{ms}}$	$-23,8 \pm 1,78 \text{ mV}$	$-35,8 \pm 2,35 \text{ mV}$	0,01*

Tab. 8 Vergleich der initialen spontanen transepithelialen elektrischen Spannungen in vitro ($\Psi_{\text{initial}}^{\text{ms}}$)

Die Daten sind den Übersichtstab. 5 und 6 entnommen.

$\Psi_{\text{initial}}^{\text{ms}}$ des intakten und des gestrippten Rectum waren also signifikant voneinander verschieden. Die spontane transepitheliale elektrische Spannung war somit schon unmittelbar nach Ende der Präparationszeit zu Beginn des in vitro - Versuches im gestrippten höher als im intakten Rectum und dies, obwohl bei den gestrippten Präparaten eine längere Zeit zwischen Entnahme des Präparates und dem Füllen der Kammer mit Lösung (t_0) verstrichen war.

4.3.1.3 Einfluß auf Ψ^{ms} (in vitro gemessen)

Ψ^{ms} wurde am intakten und gestrippten Rectum über eine Dauer von 40 min in vitro gemessen und mit dem t - Test (vgl. 3.11) verglichen :

t	Ψ^{ms} in mV		P
	intaktes Rectum n = 15	gestripptes Rectum n = 18	
7. min	-14,9 ± 1,98	-30,3 ± 3,31	0,01*
14. min	-12,3 ± 1,91	-24,5 ± 3,37	0,01*
26. min	-9,07 ± 1,55	-17,2 ± 3,10	0,04*
36. min	-6,33 ± 1,27	-13,7 ± 2,85	0,04*

Tab. 9 Einfluß des Strippens auf die spontane transepitheliale elektrische Spannung in vitro (Ψ^{ms})

Die Daten dieser Tab. sind den Übersichtstab. 5 und 6 entnommen und außerdem in Abb. 13 aufgetragen.

t : Zeit in min nach Füllung der Kammer mit Lösung

* : Der Unterschied zwischen den Kollektiven ist signifikant

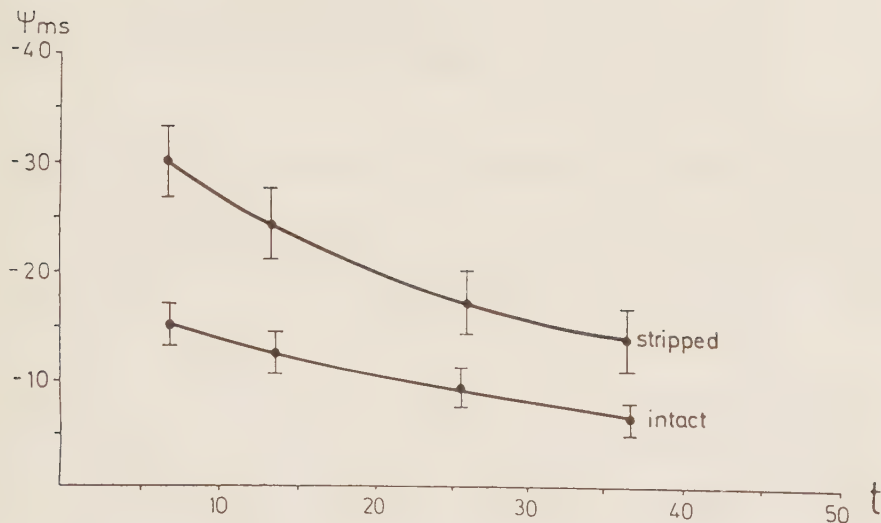


Abb. 13 Einfluß des Strippens auf die spontane transepitheliale elektrische Spannung in vitro (Ψ^{ms})

Daten der Tab. 9 .

Ψ^{ms} : spontane transepitheliale elektrische Spannung in mV
(Lumen negativ)

t : Zeit in min nach Füllung der Kammer mit Lösung

$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$: $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$ von n Darmstücken (intact : n = 15, stripped : n = 18)

Ψ^{ms} war während der gesamten Dauer des in vitro - Versuches im intakten und gestripten Rectum signifikant verschieden. Da sich die elektrischen Widerstände des intakten und gestripten Rectum nur unwesentlich unterschieden (vgl. Tab. 12), war die

höhere spontane transepitheliale elektrische Spannung der gestrippten Präparation allein auf einen größeren elektrogenen Transport zurückzuführen, was im höheren Kurzschlußstrom des gestrippten Rectum seinen Ausdruck fand (vgl. 4.3.2).

4.3.2 Einfluß des Strippens auf den Kurzschlußstrom (I_{SC})

Die Kurzschlußströme des intakten und des gestrippten Rectum wurden über eine Dauer von 40 min in vitro gemessen und mit dem t - Test (vgl. 3.11) verglichen :

t	I_{SC} in $\mu A \cdot cm^{-2}$		P
	intaktes Rectum n = 15	gestripptes Rectum n = 18	
7. min	145 $\pm$ 20,1	258 $\pm$ 33,9	0,02*
14. min	94,1 $\pm$ 15,2	199 $\pm$ 27,7	0,01*
26. min	64,1 $\pm$ 10,4	129 $\pm$ 23,7	0,03*
36.min	52,5 $\pm$ 9,53	101 $\pm$ 19,8	0,05*

Tab. 10 Einfluß des Strippens auf den Kurzschlußstrom (I_{SC})

Die Daten sind den Übersichtstab. 5 und 6 entnommen und außerdem in Abb. 14 aufgetragen .

t : Zeit in min nach Füllung der Kammer mit Lösung

* : Der Unterschied zwischen den Kollektiven ist signifikant

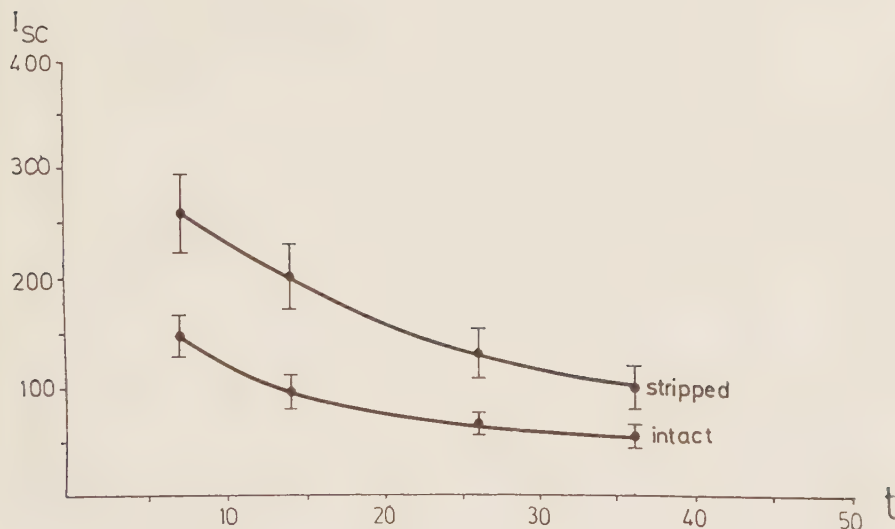


Abb. 14 Einfluß des Strippens auf den Kurzschlußstrom (I_{sc})

Daten der Tab. 10 .

I_{sc} : Kurzschlußstrom in $\mu A \cdot cm^{-2}$

t : Zeit in min nach Füllung der Kammer mit Lösung

$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$: $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$ von n Darmstücken (intact : n = 15, stripped : n = 18)

Der Kurzschlußstrom war während der gesamten Dauer des in vitro - Versuches im gestrippten Rectum höher als im intakten. Dabei fiel der Kurzschlußstrom an beiden Präparationen zunächst stärker und etwa nach 30 min nur noch geringgradig (vgl. Abb. 10) kontinuierlich mit der Zeit ab.

4.3.3 Einfluß des Strippens auf den Totalwiderstand (R_t)

Die Totalwiderstände (R_t) des intakten und des gestrippten Rectum wurden über eine Dauer von 40 min in vitro gemessen und mit dem t - Test (vgl. 3.11) verglichen :

t	R_t in $\Omega\text{-cm}^2$		P
	intaktes Rectum n = 15	gestripptes Rectum n = 18	
7. min	$124 \pm 7,58$	$111 \pm 6,96$	0,22
14. min	$152 \pm 11,8$	$126 \pm 11,0$	0,12
26. min	$172 \pm 15,9$	$125 \pm 12,6$	0,03*
36. min	$164 \pm 17,5$	$128 \pm 16,0$	0,14

Tab. 11 Einfluß des Strippens auf den Totalwiderstand (R_t)

Die Daten dieser Tab. sind den Übersichtstab. 5 und 6 entnommen und außerdem in Abb. 15 aufgetragen.

t : Zeit in min nach Füllung der Kammer mit Lösung

* : Der Unterschied zwischen den Kollektiven ist signifikant

Die Totalwiderstände des intakten und des gestrippten Rectum waren in der 36. min , nicht aber zu den 3 anderen Meßzeitpunkten (7., 14. und 36. min) signifikant voneinander verschieden.

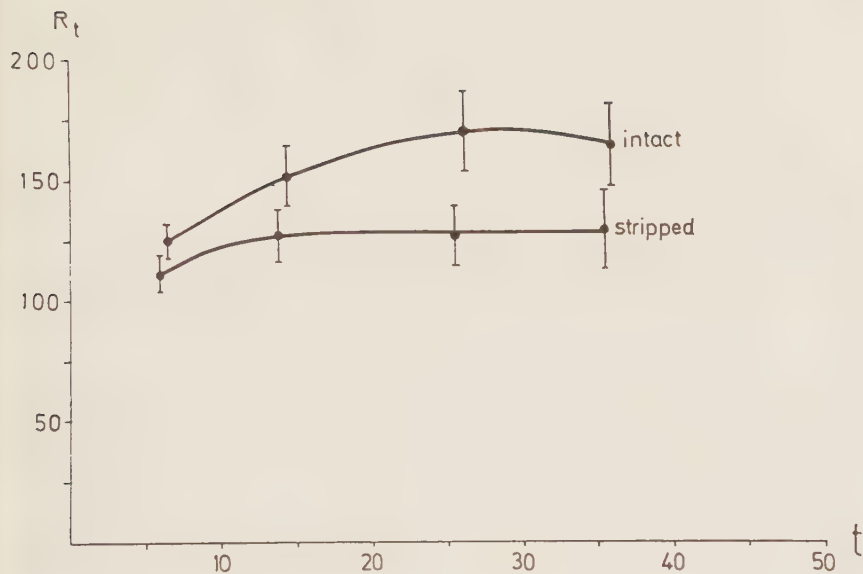


Abb. 15 Einfluß des Strippens auf den Totalwiderstand (R_t)

Daten der Tab. 11 .

R_t : Totalwiderstand in $\Omega \cdot \text{cm}^2$

t : Zeit in min nach Füllung der Kammer mit Lösung

• : $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$ von n Darmstücken (intact : n = 15, stripped :
 I : n = 18)

Die Betrachtung der graphischen Auftragung von R_t gegen die Zeit legt die Vermutung nahe, daß ein systematischer Unterschied im Sinne eines im intakten Rectum größeren Totalwiderstandes als im gestrippen Rectum besteht (vgl. 4.3.4).

4.3.4 Einfluß des Strippens auf den Parallelwiderstand (R_p)

Die Parallelwiderstände (R_p) des intakten und des gestrippten Rectum wurden über eine Dauer von 40 min in vitro ausgewertet und mit dem t - Test (vgl. 3.11) verglichen :

t	R_p in $\Omega \cdot \text{cm}^2$		P
	intaktes Rectum n = 15	gestripptes Rectum n = 18	
7. min	$96,1 \pm 6,74$	$101 \pm 6,84$	0,62
14. min	$123 \pm 10,7$	$115 \pm 11,6$	0,63
26. min	$141 \pm 16,6$	$116 \pm 13,3$	0,25
36. min	$133 \pm 18,9$	$118 \pm 16,6$	0,56

Tab. 12 Einfluß des Strippens auf den Parallelwiderstand (R_p)

Die Daten dieser Tab. sind den Übersichtstab. 5 und 6 entnommen und außerdem in Abb. 16 aufgetragen.

t : Zeit in min nach Füllung der Kammer mit Lösung

Die Parallelwiderstände des intakten und des gestrippten Rectum waren zu keinem Zeitpunkt des in vitro - Versuches signifikant voneinander verschieden.

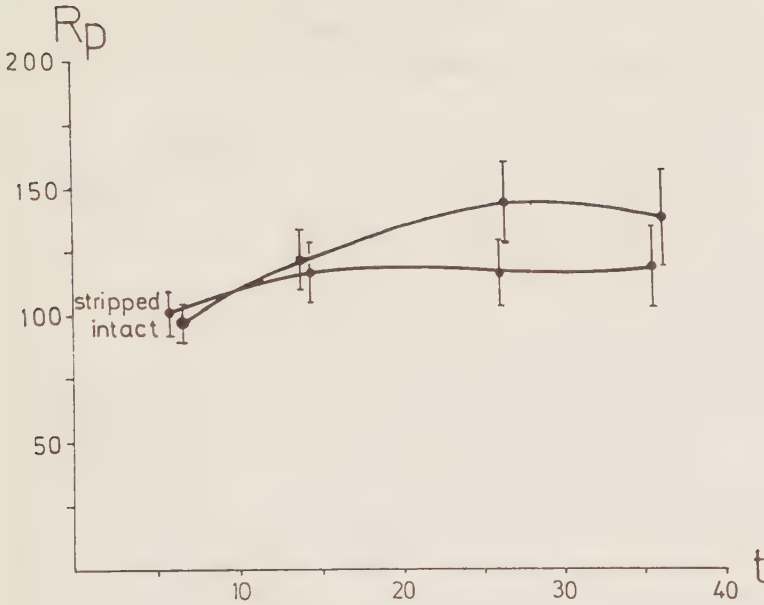


Abb. 16 Einfluß des Strippens auf den Parallelwiderstand (R_p)

Daten der Tab. 12 .

R_p : Parallelwiderstand in $\Omega \cdot \text{cm}^2$

t : Zeit in min nach Füllung der Kammer mit Lösung

$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$ von n Darmstücken (intact : n = 15, stripped :
n = 18)

Im Rahmen der erreichten Meßgenauigkeit unterschieden sich das intakte und das gestrippte Rectum in ihrem Parallelwiderstand nicht voneinander.

Die graphische Auftragung ließ eine leichte Tendenz zur Zunahme von R_p während der Dauer des in vitro - Versuches erkennen. Dieses Phänomen war im intakten Rectum stärker ausgeprägt als im gestrippten.

Um diesen Eindruck statistisch zu belegen, wurde in beiden Präparationen R_p am Anfang (7. min) und am Ende (36. min) des in vitro - Versuches mit dem t - Test für abhängige Beobachtungen (vgl. 3.11) verglichen :

	R_p in $\Omega \cdot \text{cm}^2$	
	intaktes Rectum n = 15	gestripptes Rectum n = 18
7. min	$96,1 \pm 6,74$	$101 \pm 6,84$
36. min	$133 \pm 18,9$	$118 \pm 16,6$
P	0,03*	0,19

Tab. 13 Zeitgang des Parallelwiderstandes des intakten und des gestrippten Rectum

t : Zeit in min nach Füllung der Kammer mit Lösung

Eine signifikante Änderung von R_p während der Dauer des in vitro - Versuches erfolgte also nur im intakten Rectum.

4.3.5 Einfluß des Strippens auf den Serienwiderstand (R_s)

Die Serienwiderstände (R_s) des intakten und des gestrippten Rectum wurden über eine Dauer von 40 min in vitro ausgewertet und mit dem t - Test (vgl. 3.11) verglichen :

t	R_s in $\Omega \cdot \text{cm}^2$		P
	intaktes Rectum n = 15	gestripptes Rectum n = 18	
7. min	25,8 $\pm$ 2,97	10,8 $\pm$ 1,33	0,01*
14. min	28,8 $\pm$ 2,83	10,4 $\pm$ 1,38	0,01*
26. min	29,7 $\pm$ 3,36	9,97 $\pm$ 1,53	0,01*
36. min	30,4 $\pm$ 3,65	9,61 $\pm$ 1,57	0,01*

Tab. 14 Einfluß des Strippens auf den Serienwiderstand (R_s)

Die Daten dieser Tab. sind den Übersichtstab. 5 und 6 entnommen und außerdem in Abb. 17 aufgetragen :

t : Zeit in min nach Füllung der Kammer mit Lösung

* : Der Unterschied zwischen den Kollektiven ist signifikant

Die Serienwiderstände des gestrippten Rectum waren während der gesamten Dauer des in vitro - Versuches von denen des intakten Rectum signifikant verschieden.

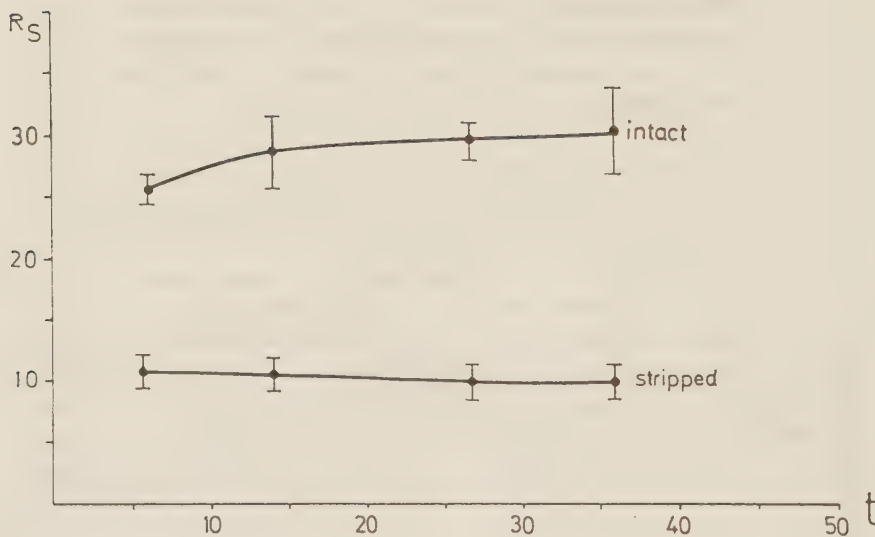


Abb. 17 Einfluß des Strippens auf den Serienwiderstand (R_S)

Daten der Tab. 14 .

R_S : Serienwiderstand in $\Omega \cdot \text{cm}^2$

t : Zeit in min nach Füllung der Kammer mit Lösung

$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$ von n Darmstücken (intact : n = 15, stripped : n = 18)

Während der gesamten Dauer des in vitro - Versuches war R_S an beiden Präparationen zeitlich annähernd konstant. Für die weiteren Auswertungen wurde deshalb der Mittelwert von R_S aus den 4 Meßzeitpunkten gebildet :

R_s in $\Omega \cdot \text{cm}^2$		P
intaktes Rectum	gestripptes Rectum	
$28,7 \pm 3,05$	$10,2 \pm 1,41$	0,01*

Tab. 15 Mittlerer Serienwiderstand der intakten und der gestrippten Präparation während der Dauer des in vitro - Versuches

* : Der Unterschied zwischen den Kollektiven ist signifikant

Der Effekt des Strippens bestand also in einer Abnahme des Serienwiderstandes (R_s) von $28,7 \Omega \cdot \text{cm}^2$ im intakten Rectum auf $10,2 \Omega \cdot \text{cm}^2$ im gestrippten Rectum. Der Serienwiderstand des beim Strippen entfernten subepithelialen Gewebes betrug demnach $18,5 \pm 3,36 \Omega \cdot \text{cm}^2$. Durch das Strippen wurde der subepitheliale Gewebswiderstand also um 64% reduziert.

4.3.6 Einfluß des Strippens auf die apparente Parallelkapazität (C_p)

Die apparente parallele Kapazität wurde über eine Dauer von 40 min in vitro ausgewertet und mit dem t - Test (vgl. 3.11) verglichen :

t	C_p in $\mu F \cdot cm^{-2}$		P
	intaktes Rectum n = 15	gestripptes Rectum n = 18	
7. min	$18,0 \pm 1,82$	$13,8 \pm 1,02$	0,05*
14. min	$16,5 \pm 1,40$	$13,4 \pm 0,95$	0,07
26. min	$14,4 \pm 1,10$	$12,0 \pm 0,79$	0,08
36. min	$13,0 \pm 0,96$	$11,0 \pm 0,72$	0,10

Tab. 16 Einfluß des Strippens auf die apparente Parallelkapazität (C_p)

Die Daten dieser Tab. sind den Übersichtstab. 5 und 6 entnommen und außerdem in Abb. 18 aufgetragen.

t : Zeit in min nach Füllung der Kammer mit Lösung

* : Der Unterschied zwischen den Kollektiven ist signifikant

C_p war zu Beginn des in vitro - Versuches in den beiden Präparationen signifikant verschieden (7. min), im weiteren Verlauf (14., 26., 36. min) jedoch nicht mehr.

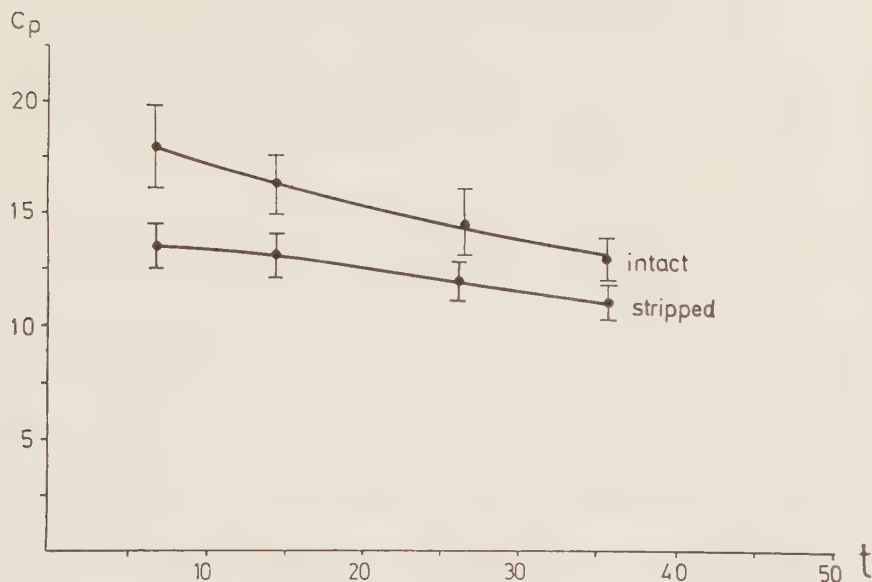


Abb. 18 Einfluß des Strippens auf die apparente Parallelkapazität (C_p)

Daten der Tab. 16 .

C_p : apparente parallele Kapazität in $\mu F \cdot cm^{-2}$

t : Zeit in min nach Füllung der Kammer mit Lösung

$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$: $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$ von n Darmstücken (intact : n = 15, stripped : n = 18)

Die Betrachtung der Abb. 18 legt einen systematischen Unterschied von C_p zwischen intaktem und gestripptem Rectum nahe, auch wenn ein signifikanter Unterschied nur zu Beginn des in vitro - Versuches bestand.

Während der Dauer des in vitro - Versuches zeigte C_p in beiden Präparationen eine Tendenz zur Abnahme. Um diese Tendenz statistisch zu prüfen, wurde für beide Präparationen C_p am Anfang (7. min) und am Ende (36. min) des in vitro - Versuches mit dem t - Test für abhängige Beobachtungen (vgl. 3.11) verglichen :

	C_p in $\mu F \cdot cm^{-2}$	
	intaktes Rectum n = 15	gestripptes Rectum n = 18
7. min	$18,0 \pm 1,82$	$13,8 \pm 1,02$
36. min	$13,0 \pm 0,96$	$11,0 \pm 0,72$
P	0,01*	0,01*

Tab. 17 Zeitgang der parallelen Kapazität des intakten und des gestrippten Rectum

t : Zeit in min nach Füllung der Kammer mit Lösung

* : Der Unterschied von C_p in der 7. und der 36. min des in vitro - Versuches ist signifikant

In beiden Präparationen fiel also C_p während der Dauer des in vitro - Versuches signifikant ab. C_p wurde ausgewertet, weil in der Literatur (31) aus Änderungen von C_p auf Änderungen des Dehnungszustandes von Epithellen geschlossen und elektrische Meßgrößen mit Hilfe von C_p auf eine "effektive" Membranfläche standardi-

siert wurden. Dies ist jedoch höchstens für "ideal dichte" oder "ideal durchlässige" Epithelien in gewissen Grenzen zulässig (vgl. 5.4.3 Diskussion).

4.3.7 Einfluß des Strippens auf die Lage des Mittelpunktes der Ortskurven der Impedanz (Winkel α)

Die Winkel α des intakten und des gestrippten Rectum wurden über eine Dauer von 40 min in vitro ausgewertet und mit dem t - Test (vgl. 3.11) verglichen :

t	Winkel α in Grad		P
	intaktes Rectum n = 15	gestripptes Rectum n = 18	
7. min	27,7 $\pm$ 1,21	26,4 $\pm$ 2,44	0,66
14. min	23,7 $\pm$ 0,82	22,3 $\pm$ 1,73	0,50
26. min	22,5 $\pm$ 0,98	23,0 $\pm$ 0,99	0,84
36. min	23,4 $\pm$ 0,96	20,2 $\pm$ 0,99	0,03*

Tab. 18 Einfluß des Strippens auf die Lage des Mittelpunktes der Ortskurven der Impedanz (Winkel α)

Die Daten dieser Tab. sind den Übersichtstab. 5 und 6 entnommen.

t : Zeit in min nach Füllung der Kammer mit Lösung

* : Der Unterschied zwischen den Kollektiven ist signifikant

Die Betrachtung der Absolutwerte und des Zeitganges der α - Werte führt zu dem Ergebnis, daß

1. der Winkel α in beiden Präparationen während der Dauer des in vitro - Versuches eine leichte Tendenz zur Abnahme zeigt und daß
2. die Absolutwerte für den Winkel α in beiden Präparationen fast gleich waren. Das Strippen hatte also keinen Einfluß auf den Winkel α .

4.4 Segmentale Heterogenität einiger elektrophysiologischer Eigenschaften des Dickdarmes der Ratte

Die segmentalen Unterschiede der elektrischen Eigenschaften des Dickdarmes der Ratte wurden durch den Vergleich der spontanen transepithelialen elektrischen Spannung (Ψ^{ms}), des Totalwiderstandes (R_t), des Parallelwiderstandes (R_p), des Serienwiderstandes (R_s), der apparenten parallelen Kapazität (C_p) und der Lage des Mittelpunktes der Ortskurven der Impedanz (Winkel α) in 3 verschiedenen Darmsegmenten untersucht.

Das Kollektiv 2 bestand aus 18 gestrippten Darmstücken aus dem Rectum, das Kollektiv 3 aus 7 gestrippten Darmstücken aus dem Colon descendens und das Kollektiv 4 aus 8 gestrippten Darmstücken aus dem Colon ascendens (zur Lokalisation der 3 Darmsegmente vgl. 3.1.1).

Wie unter 4.3 beschrieben, wurde aus den Originalmeßdaten der Darmstücke für jedes Kollektiv der Mittelwert und der mittlere Fehler des Mittelwertes des jeweiligen Meßparameters gebildet. Eine Übersicht über alle Daten des Colon descendens ist in Tab. 19, für das Colon ascendens in Tab. 20 aufgelistet. Da das hier verwendete Kollektiv 2 mit dem unter 4.3 aufgeführten Kollektiv 2 identisch ist, können die Mittelwerte und mittleren Fehler der Mittelwerte des Rectum der Tab. 6 entnommen werden.

Im folgenden werden dann die segmentalen Unterschiede der einzelnen Meßwerte getrennt besprochen.

Abb. 19 $\bar{x}$ und $S_{\bar{x}}$ der Meßwerte am gestrippten Colon descendens (Kollektiv 3, n = 7)

Meßart	in vitro			
	7. min	14. min	26. min	36. min
Zeit (t_0 = Füllung der Kammer mit Lösung)				
ψ_{ms} in mV	-8,57 $\pm$ 1,86	-4,71 $\pm$ 1,04	-1,14 $\pm$ 0,26	-0,86 $\pm$ 0,26
R_t in $\Omega \cdot cm^2$	59,1 $\pm$ 11,1	58,5 $\pm$ 13,3	56,4 $\pm$ 16,8	57,0 $\pm$ 19,3
R_p in $\Omega \cdot cm^2$	41,3 $\pm$ 7,08	41,4 $\pm$ 8,36	40,2 $\pm$ 12,6	41,6 $\pm$ 15,1
R_s in $\Omega \cdot cm^2$	17,9 $\pm$ 8,11	17,2 $\pm$ 7,66	16,2 $\pm$ 7,68	15,4 $\pm$ 7,29
C_p in $\mu F \cdot cm^{-2}$	22,7 $\pm$ 3,83	18,8 $\pm$ 2,54	16,3 $\pm$ 2,47	17,2 $\pm$ 4,32
Winkel α in Grad	11,3 $\pm$ 3,60	12,1 $\pm$ 1,92	5,24 $\pm$ 3,06	10,9 $\pm$ 1,50

Tab. 20 $\bar{x}$ und S_x der Meßwerte am gestrippten Colon ascendens (Kollektiv 4, n = 8)

Meßart	in vitro			
	7. min	14. min	26. min	36. min
Zeit (t_0 = Füllung der Kammer mit Lösung)				
ψ^{ms} in mV	$-9,50 \pm 0,76$	$-7,38 \pm 0,46$	$-5,63 \pm 0,75$	$-4,25 \pm 0,86$
R_t in $\Omega \cdot cm^2$	$66,6 \pm 4,48$	$64,1 \pm 4,47$	$60,3 \pm 6,47$	$55,8 \pm 7,08$
R_p in $\Omega \cdot cm^2$	$45,9 \pm 4,40$	$45,6 \pm 5,29$	$44,9 \pm 7,64$	$42,1 \pm 8,44$
R_s in $\Omega \cdot cm^2$	$20,6 \pm 3,35$	$18,2 \pm 3,98$	$15,5 \pm 4,39$	$13,7 \pm 4,33$
C_p in $\mu F \cdot cm^{-2}$	$16,2 \pm 2,35$	$15,1 \pm 1,87$	$11,9 \pm 0,96$	$10,5 \pm 1,12$
Winkel α in Grad	$18,5 \pm 2,52$	$21,1 \pm 2,91$	$13,0 \pm 4,35$	$11,9 \pm 5,53$

4.4.1 Segmentale Unterschiede der spontanen transepithelialen elektrischen Spannung (Ψ^{ms})

Die spontane transepitheliale elektrische Spannung (Ψ^{ms}) des gestrippten Colon ascendens, Colon descendens und Rectum wurde über eine Dauer von 40 min in vitro gemessen und mit dem t - Test (vgl. 3.11) verglichen :

t	Ψ^{ms} in mV		
	Colon ascendens n = 8	Colon descendens n = 7	Rectum n = 18
7. min	-9,50 $\pm$ 0,76	-8,57 $\pm$ 1,86	-30,3 $\pm$ 3,31
14. min	-7,38 $\pm$ 0,46	-4,71 $\pm$ 1,04	-24,5 $\pm$ 3,37
26. min	-5,63 $\pm$ 0,75	-1,14 $\pm$ 0,26	-17,2 $\pm$ 3,10
36. min	-4,25 $\pm$ 0,86	-0,86 $\pm$ 0,26	-13,7 $\pm$ 2,85

Tab. 21a Segmentale Unterschiede der transepithelialen elektrischen Spannung (Ψ^{ms})

Die Daten dieser Tab. wurden den Übersichtstab. 6, 19 und 20 entnommen und sind außerdem in Abb. 19 aufgetragen. Die Resultate der Signifikanzberechnungen (P - Werte) sind in Tab. 21 b zusammengestellt.

t : Zeit in min nach Füllung der Kammer mit Lösung

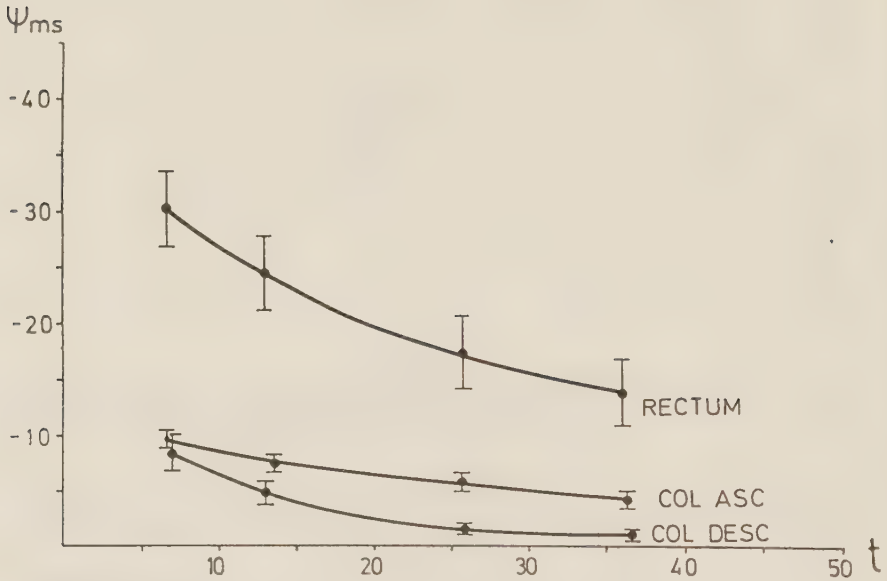


Abb. 19 Segmentale Unterschiede der spontanen transepithelialen elektrischen Spannung (Ψ^{ms})

Daten der Tab. 21 .

Ψ^{ms} : spontane transepitheliale elektrische Spannung in mV
(Lumen negativ)

t : Zeit in min nach Füllung der Kammer mit Lösung

$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$: $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$ von n Darmstücken (Colon ascendens : n = 8,
Colon descendens : n = 7, Rectum : n = 18)

Die Betrachtung von Tab. 21 und Abb. 19 erlaubt folgende Feststellungen :

1. Ψ^{ms} war im Rectum während der gesamten Dauer des in vitro - Versuches wesentlich größer als in den beiden Colonsegmenten.
2. Am Beginn des in vitro - Versuches war Ψ^{ms} in beiden Colonsegmenten gleich, fiel dann aber im Colon descendens stärker ab als im Colon ascendens.
3. Ψ^{ms} fiel während des in vitro - Versuches in allen 3 Segmenten zunächst stärker, dann nur noch geringgradig kontinuierlich mit der Zeit ab.

4.4.2 Segmentale Unterschiede des Totalwiderstandes (R_t)

Die R_t - Werte des gestrippten Colon ascendens, Colon descendens und Rectum wurden 40 min lang in vitro gemessen und mit dem t - Test (vgl. 3.11) verglichen :

t	R_t in $\Omega \cdot \text{cm}^2$		
	Colon ascendens n = 8	Colon descendens n = 7	Rectum n = 18
7. min	$66,6 \pm 4,48$	$59,1 \pm 11,1$	$111 \pm 6,96$
14. min	$64,1 \pm 4,47$	$58,5 \pm 13,3$	$126 \pm 11,0$
26. min	$60,3 \pm 6,47$	$56,4 \pm 16,8$	$125 \pm 12,6$
36. min	$55,8 \pm 7,08$	$57,0 \pm 19,3$	$128 \pm 16,0$

Tab. 22a Segmentale Unterschiede des Totalwiderstandes (R_t)

Die Daten dieser Tab. wurden den Übersichtstab. 6, 19 und 20 entnommen und sind außerdem in Abb.20 aufgetragen. Die Resultate der Signifikanzberechnungen (P - Werte) sind in Tab. 21b zusammengestellt.

t : Zeit in min nach Füllung der Kammer mit Lösung

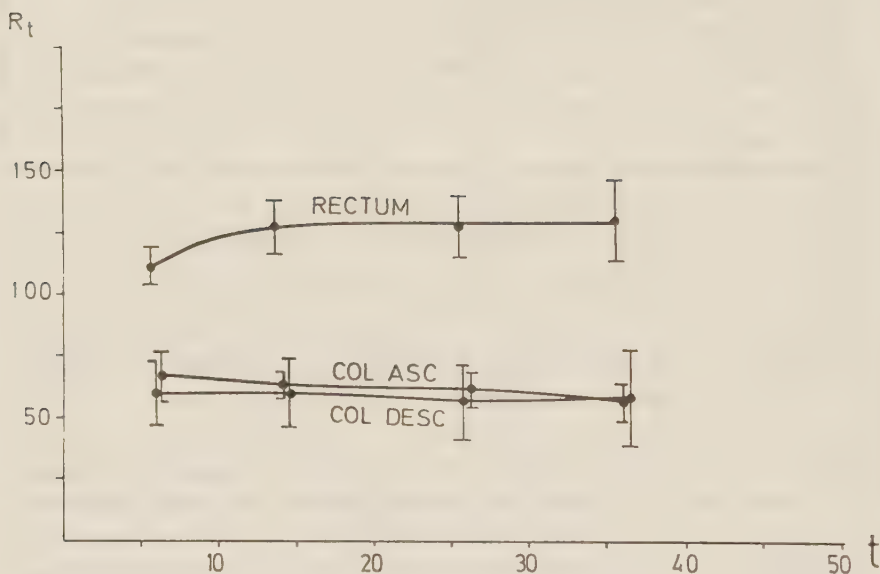


Abb. 20 Segmentale Unterschiede des Totalwiderstandes (R_t)

Daten der Tab. 22 .

R_t : Totalwiderstand in $\Omega \cdot \text{cm}^2$

t : Zeit in min nach Füllung der Kammer mit Lösung

$\bullet$: $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$ von n Darmstücken (Colon ascendens : $n = 8$,
Colon descendens : $n = 7$, Rectum : $n = 18$)

Während der gesamten Dauer des in vitro - Versuches war der Totalwiderstand im Rectum signifikant verschieden von denen in den beiden Colonsegmenten. R_t der beiden Colonsegmente unterschied sich zu keiner Zeit signifikant voneinander.

Da die Absolutwerte der Serienwiderstände (R_s)⁺ der 3 untersuchten Segmente fast eine Größenordnung kleiner waren als die entsprechenden Totalwiderstände (R_t) und sich auch nicht wesentlich voneinander unterschieden, spiegelt sich in den Totalwiderständen im wesentlichen das Verhältnis der Parallelwiderstände zueinander wider. Insofern ist die Interpretation des Zeitganges der Totalwiderstände mit der für die Parallelwiderstände identisch (vgl. 4.4.3).

⁺ R_s ist mit R_t durch die Beziehung $R_t = R_s + R_p$ verknüpft (vgl. 3.7.5).

4.4.3 Segmentale Unterschiede des Parallelwiderstandes (R_p)

Die Parallelwiderstände des gestrippten Colon ascendens, Colon descendens und Rectum wurden über eine Dauer von 40 min in vitro ausgewertet und mit dem t - Test (vgl. 3.11) verglichen :

t	R_p in Ωcm^2		
	Colon ascendens n = 8	Colon descendens n = 7	Rectum n = 18
7. min	45,9 $\pm$ 4,40	41,3 $\pm$ 7,08	101 $\pm$ 6,84
14. min	45,6 $\pm$ 5,29	41,4 $\pm$ 8,36	115 $\pm$ 11,6
26. min	44,9 $\pm$ 7,64	40,2 $\pm$ 12,6	116 $\pm$ 13,3
36. min	42,1 $\pm$ 8,44	41,6 $\pm$ 15,1	118 $\pm$ 16,6

Tab. 23a Segmentale Unterschiede des Parallelwiderstandes(R_p)

Die Daten dieser Tab. wurden den Übersichtstab. 6, 19 und 20 entnommen und sind außerdem in Abb. 21 aufgetragen. Die Resultate der Signifikanzberechnungen (P - Werte) sind in Tab. 23b zusammengestellt.

t : Zeit in min nach Füllung der Kammer mit Lösung

t	P (Ca - Cd)	P (Ca - R)	P (Cd - R)
7. min	0,59	0,01*	0,01*
14. min	0,68	0,01*	0,01*
26. min	0,75	0,01*	0,01*
36. min	0,98	0,01*	0,02*

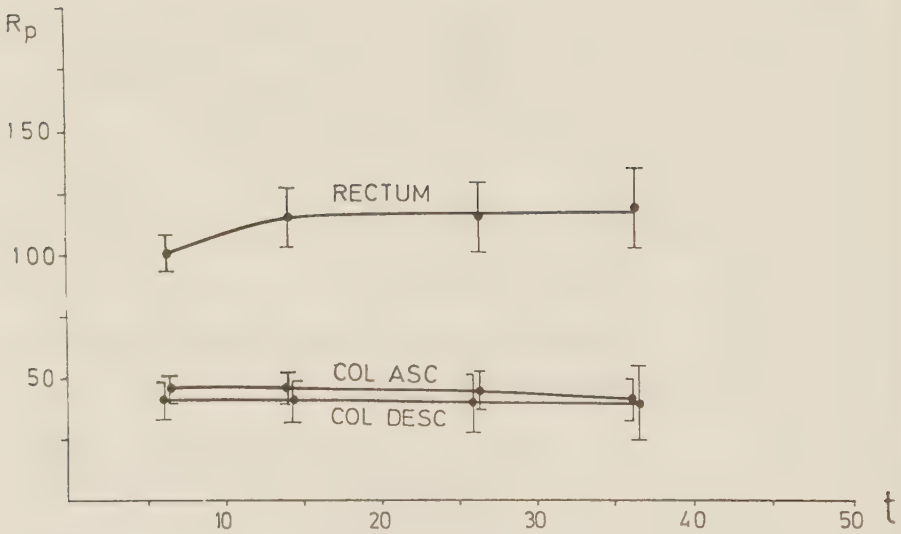


Abb. 21 Segmentale Unterschiede des Parallelwiderstandes (R_p)

Daten der Tab. 23 .

R_p : Parallelwiderstand in $\Omega \cdot \text{cm}^2$

t : Zeit in min nach Füllung der Kammer mit Lösung

$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$: $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$ von n Darmstücken (Colon ascendens : $n = 8$,
Colon descendens : $n = 7$, Rectum : $n = 18$)

Während der gesamten Dauer des in vitro - Versuches war der Parallelwiderstand des Rectum signifikant verschieden von dem der Colonsegmente. Zwischen den beiden Colonsegmenten bestand kein signifikanter Unterschied für R_p . Zusammengefaßt lautet das Ergebnis der Auswertung der Parallelwiderstände :

1. Der Parallelwiderstand aller 3 untersuchten Segmente blieb während der gesamten Dauer des in vitro - Versuches annähernd konstant. Dies gilt für die hier verwendeten gestrippten Präparate, nicht für ungestrippte (vgl. 4.3.4).
2. Der Parallelwiderstand des Rectum war etwa 2,5 mal so groß wie der der beiden Colonsegmente.
3. In den beiden Colonsegmenten war der Parallelwiderstand fast gleich.

4.4.4 Segmentale Unterschiede des Serienwiderstandes (R_s)

Die Serienwiderstände des gestrippten Colon ascendens, Colon descendens und Rectum wurden über eine Dauer von 40 min in vitro ausgewertet und mit dem t - Test (vgl. 3.11) verglichen :

t	R_s in $\Omega \cdot \text{cm}^2$		
	Colon ascendens n = 8	Colon descendens n = 7	Rectum n = 18
7. min	$20,6 \pm 3,35$	$17,9 \pm 8,11$	$10,8 \pm 1,33$
14. min	$18,2 \pm 3,98$	$17,2 \pm 7,66$	$10,4 \pm 1,38$
26. min	$15,5 \pm 4,39$	$16,2 \pm 7,68$	$9,97 \pm 1,53$
36. min	$13,7 \pm 4,33$	$15,4 \pm 7,29$	$9,61 \pm 1,57$

Tab. 24a Segmentale Unterschiede des Serienwiderstandes (R_s)

Die Daten dieser Tab. sind den Übersichtstab. 6, 19 und 20 entnommen und außerdem in Abb. 22 aufgetragen. Die Resultate der Signifikanzberechnungen (P - Werte) sind in Tab. 24b zusammengestellt.

t : Zeit in min nach Füllung der Kammer mit Lösung

t	P (Ca - Cd)	P (Ca - R)	P (Cd - R)
7. min	0,76	0,01*	0,20
14. min	0,91	0,03*	0,20
26. min	0,94	0,15	0,27
36. min	0,84	0,28	0,27

Tab. 24b P - Werte für den Vergleich der Serienwiderstände
(R_S) in Tab. 24a

- t : Zeit in min nach Füllung der Kammer mit Lösung
- P (Ca - Cd) : P - Wert für den Vergleich von Colon ascendens
und Colon descendens
- P (Ca - R) : P - Wert für den Vergleich von Colon ascendens
und Rectum
- P (Cd - R) : P - Wert für den Vergleich von Colon descendens
und Rectum
- * : Der Unterschied zwischen den Kollektiven ist sig-
nifikant

Die Serienwiderstände der 3 untersuchten Segmente sind
in Abb. 22 graphisch gegen die Zeit aufgetragen :

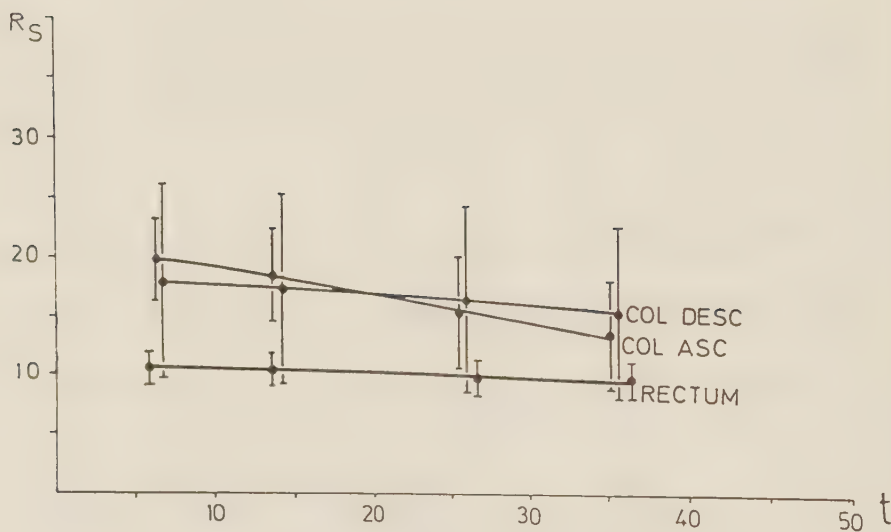


Abb. 22 Segmentale Unterschiede des Serienwiderstandes (R_s)

Daten der Tab. 24 .

R_s : Serienwiderstand in $\Omega \cdot \text{cm}^2$

t : Zeit in min nach Füllung der Kammer mit Lösung

$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$ von n Darmstücken (Colon ascendens : n = 8,
 Colon descendens : n = 7, Rectum : n = 18)

Der Serienwiderstand der 3 untersuchten Segmente war während der gesamten Dauer des in vitro - Versuches nicht signifikant voneinander verschieden, mit Ausnahme eines signifikanten Unterschiedes zwischen dem Colon ascendens und dem Rectum zu Beginn des in vitro -

Versuches (7. und 14. min.). Das Ergebnis der Auswertung von R_s lautet zusammengefaßt :

1. Während der gesamten Dauer des in vitro - Versuches war R_s an allen 3 untersuchten Segmenten zeitlich annähernd konstant. Für die weiteren Auswertungen wurde deshalb der Mittelwert für R_s aus den 4 Meßzeitpunkten gebildet :

R_s in $\Omega \cdot \text{cm}^2$		
Colon ascendens n = 8	Colon descendens n = 7	Rectum n = 18
17,0 $\pm$ 3,95	16,7 $\pm$ 7,68	10,2 $\pm$ 1,41

Tab. 25 Mittlerer Serienwiderstand des Colon ascen-
dens, Colon descendens und Rectum während
der Dauer des in vitro - Versuches

2. Der Serienwiderstand der beiden Colonsegmente war fast gleich.
3. Der Serienwiderstand des Rectum war um ca. 7 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ kleiner als der der beiden Colonsegmente.
4. Die größeren mittleren Fehler des Mittelwertes ($S_{\bar{x}}$) in den beiden Colonsegmenten sind auf die geringere Größe der Versuchskollektive im Vergleich zum Rectum zurückzuführen.

4.4.5 Segmentale Unterschiede der apparenten Parallelkapazität (C_p)

Die apparenten parallelen Kapazitäten (C_p) wurden für das Colon ascendens, Colon descendens und Rectum in vitro über eine Dauer von 40 min ausgewertet und die Resultate mit dem t - Test (vgl. 3.11) verglichen :

t	C_p in $\mu F \cdot cm^{-2}$		
	Colon ascendens n = 8	Colon descendens n = 7	Rectum n = 18
7. min	$16,2 \pm 2,35$	$22,7 \pm 3,83$	$13,8 \pm 1,02$
14. min	$15,1 \pm 1,87$	$18,8 \pm 2,54$	$13,4 \pm 0,95$
26. min	$11,9 \pm 0,96$	$16,3 \pm 2,47$	$12,0 \pm 0,79$
36. min	$10,5 \pm 1,12$	$17,2 \pm 4,32$	$11,0 \pm 0,72$

Tab. 26a Segmentale Unterschiede der apparenten Parallelkapazität (C_p)

Die Daten dieser Tab. sind den Übersichtstab. 6, 19 und 20 entnommen und außerdem in Abb. 23 graphisch aufgetragen. Die Resultate der Signifikanzberechnungen (P - Werte) sind in Tab. 26b zusammengestellt.

t : Zeit in min nach Füllung der Kammer mit Lösung

t	P (Ca - Cd)	P (Ca - R)	P (Cd - R)
7. min	0,17	0,27	0,01*
14. min	0,25	0,39	0,03*
26. min	0,11	0,93	0,04*
36. min	0,14	0,75	0,04*

Tab. 26b P - Werte für den Vergleich der apparenten parallelen Kapazitäten (C_p) in Tab. 26a

- t : Zeit in min nach Füllung der Kammer mit Lösung
- P (Ca - Cd) : P - Wert für den Vergleich von Colon ascendens und Colon descendens
- P (Ca - R) : P - Wert für den Vergleich von Colon ascendens und Rectum
- P (Cd - R) : P - Wert für den Vergleich von Colon descendens und Rectum
- * : Der Unterschied zwischen den Kollektiven ist signifikant

Die apparenten parallelen Kapazitäten der 3 untersuchten Darmsegmente sind in Abb. 23 graphisch gegen die Zeit aufgetragen :

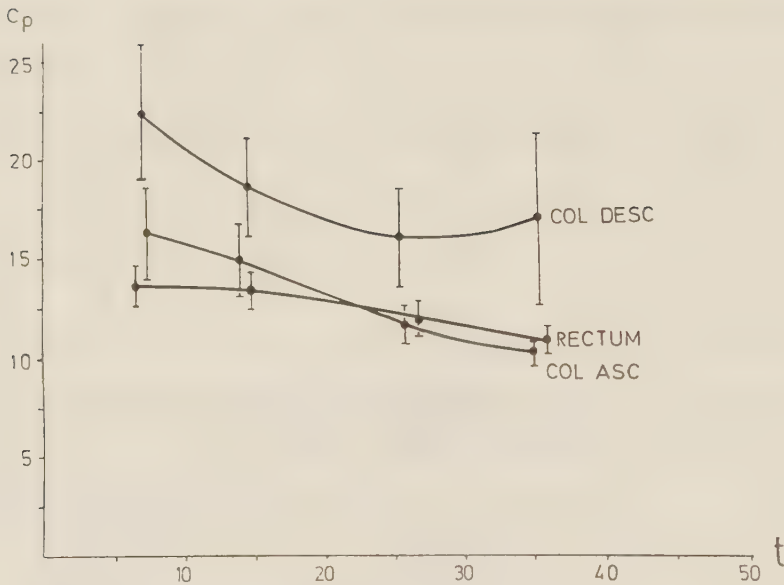


Abb. 23 Segmentale Unterschiede der apparenten parallelen Kapazität (C_p)

Daten der Tab. 26 .

C_p : apparente parallele Kapazität in $\mu F \cdot cm^{-2}$

t : Zeit in min nach Füllung der Kammer mit Lösung

$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$: $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$ von n Darmstücken (Colon ascens : n = 8,
Colon descendens : n = 7 und Rectum : n = 18)

Die apparenten parallelen Kapazitäten des Rectum und des Colon descendens waren während der gesamten Dauer des in vitro - Versuches signifikant voneinander verschieden. Die C_p - Werte des Colon ascendens un-

terschieden sich dagegen von den beiden anderen untersuchten Segmenten zu keinem Zeitpunkt des in vitro - Versuches signifikant. Zusammengefaßt lautet das Ergebnis der Auswertung der apparenten parallelen Kapazität :

1. Das Colon descendens zeigte eine im Mittel etwa $5 \mu\text{F} \cdot \text{cm}^{-2}$ größere apparente parallele Kapazität als das Colon ascendens und das Rectum.
2. Rectum und Colon ascendens unterschieden sich hinsichtlich C_p nicht.
3. Die apparente parallele Kapazität zeigte in allen 3 untersuchten Segmenten während des in vitro - Versuches eine leichte Tendenz zur Abnahme.

4.4.6 Segmentale Unterschiede der Lage des Mittelpunktes der Ortskurven der Impedanz (Winkel α)

Der Winkel α wurde im Colon ascendens, Colon descendens und Rectum über eine Dauer von 40 min in vitro ausgewertet :

t	Winkel α in Grad		
	Colon ascendens n = 8	Colon descendens n = 7	Rectum n = 18
7. min	18,5 $\pm$ 2,52	11,3 $\pm$ 3,60	26,4 $\pm$ 2,44
14. min	21,1 $\pm$ 2,91	12,1 $\pm$ 1,92	22,3 $\pm$ 1,73
26. min	13,0 $\pm$ 4,35	5,24 $\pm$ 3,06	23,0 $\pm$ 2,02
36. min	11,9 $\pm$ 5,53	10,9 $\pm$ 1,50	20,2 $\pm$ 0,99

Tab. 27 Segmentale Unterschiede der Lage des Mittelpunktes der Ortskurven der Impedanz (Winkel α)

Die Daten dieser Tab. sind den Übersichtstab. 6, 19 und 20 entnommen.

t : Zeit in min nach Füllung der Kammer mit Lösung

Das Ergebnis des segmentalen Vergleichs des Winkel α lautet :

1. Der Winkel α zeigt in allen 3 untersuchten Segmenten während der Dauer des in vitro - Versuches eine leichte Tendenz zur Abnahme.
2. Die Absolutwerte für den Winkel α sind im Rectum etwa doppelt so groß wie in den beiden Colonsegmenten. Dies könnte auf einen größeren Unterschied von mehreren (mindestens 2) Zeitkonstanten im Rectum hinweisen (vgl. 5.4 Diskussion).

4.5 Histologie des Dickdarmes der Ratte

Die Abb. 24a-d zeigen 4 Schnitte durch das intakte und gestrippte Rectum, das gestrippte Colon descendens und das gestrippte Colon ascendens.

Bei den 3 gestrippten Darmstücken ist die Tunica serosa, die Tela subserosa und die Tunica muscularis vollständig und die Tela submucosa zum Teil entfernt. Die Trennung der beiden Schichten beim Strippen mit der von uns angewandten Methode (vgl. 3.5) erfolgte in der Tela submucosa.

Die Lamina epithelialis tunicae mucosae besteht in allen 3 Segmenten aus einschichtigem Zylinderepithel, dessen Oberfläche durch zahlreiche, mit Becherzellen besetzte Krypten vergrößert ist.

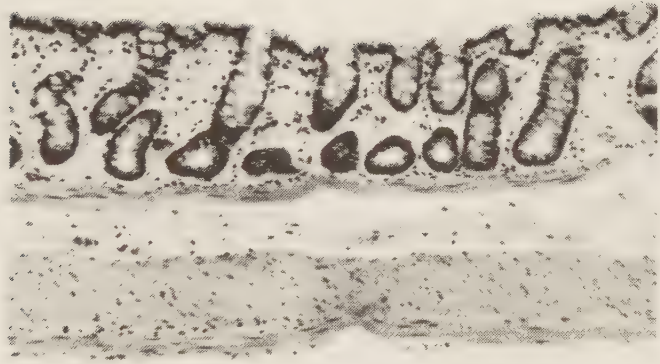


Abb. 24a Histologischer Schnitt durch das intakte
Rectum

Das intakte Rectum besitzt tiefe Krypten (durchschnittlich $147\text{ }\mu\text{m}$), die mit kleinen Becherzellen besetzt sind. Die Dichte des Becherzellbesatzes nimmt zur Basis der Krypten hin ab. Das subepitheliale Gewebe (vgl. 3.9.2) besitzt durchschnittlich eine Schichtdicke von $238\text{ }\mu\text{m}$.



Abb. 24b Histologischer Schnitt durch das gestrippte Rectum

Das gestrippte Rectum weist mit einer durchschnittlichen Kryptentiefe von $104\ \mu\text{m}$ etwas weniger tiefe Krypten auf als das intakte. Dabei wirkt das gestrippte Darmstück im Vergleich zum intakten insgesamt etwas in die Breite gezogen. Auch fällt eine geringere Zahl von Krypten pro Oberflächenlänge gegenüber dem intakten auf. Das subepitheliale Gewebe (vgl. 3.9.2) besitzt eine durchschnittliche Schichtdicke von $54\ \mu\text{m}$.

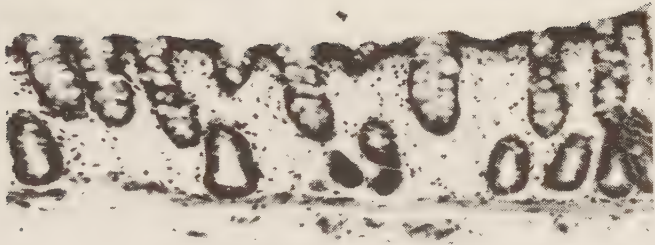


Abb. 24c Histologischer Schnitt durch das gestrippte
Colon descendens

Das gestrippte Colon descendens besitzt eine dem gestrippten Rectum vergleichbare Kryptentiefe (durchschnittlich $106\ \mu\text{m}$). Auch stimmt die Zahl der Krypten pro Oberflächenlänge mit der des gestrippten Rectum überein. Die Krypten selbst sind mit kleinen bis mittelgroßen hellen Becherzellen besetzt, deren Zahl auch hier - vergleichbar mit dem Befund am Rectum - zur Basis der Krypten hin abnimmt. Die Schichtdicke des subepithelialen Gewebes beträgt durchschnittlich $36\ \mu\text{m}$.



Abb. 24d Histologischer Schnitt durch das gestrippte Colon ascendens

Das gestrippte Colon ascendens besitzt mit einer durchschnittlichen Kryptentiefe von $133\text{ }\mu\text{m}$ die tiefsten Krypten⁺ der 3 untersuchten Darmsegmente, die hier auch am dichtesten beieinander liegen. Die Krypten sind mit mittelgroßen bis großen hellen Becherzellen besetzt, deren Zahl zur Basis der Krypten hin eher zunimmt. Im Gegensatz zum Rectum und Colon descendens ist die Zahl der Becherzellen am Boden der Krypten am größten. Das subepitheliale Gewebe weist eine durchschnittliche Schichtdicke von $55\text{ }\mu\text{m}$ auf.

⁺ unter Berücksichtigung nur der gestrippten Präparationstechnik

4.6 Morphometrie am Dickdarm der Ratte

Morphometrische Untersuchungen wurden an 4 Kollektiven (Tab. 1) ausgeführt, dem Kollektiv 5 (Rectum intakt), dem Kollektiv 6 (Rectum gestrippt), dem Kollektiv 7 (Colon descendens, gestrippt) und dem Kollektiv 8 (Colon ascendens, gestrippt).

An jedem der 4 Kollektive wurden die Größen Dicke des subepithelialen Gewebes (B), Tiefe der Krypten (t), Außendurchmesser der Krypten (d), luminaler Durchmesser der Krypten (l), Zahl der Krypten pro 1 mm Oberflächenlänge (N_{mm}^{Kr}), Zahl der Krypten pro 1 mm² Oberfläche (N_{mm}^{Kr2}) und der Oberflächenfaktor (OF) erhoben (vgl. 3.9.2) und in Tab. 28 aufgelistet :

Darmsegment	$\bar{B}$ in μm	$\pm$ in μm	$\bar{d}$ in μm	$\bar{l}$ in μm	$N_{\text{mm}}^{\text{Kr}2}$	OF
Rectum intakt n = 7	238 $\pm$ 57	147 $\pm$ 16,2	53,3 $\pm$ 2,73	12,2 $\pm$ 1,01	194 $\pm$ 10,7	2,23 $\pm$ 0,15
Rectum gestriipt n = 7	54 $\pm$ 9	104 $\pm$ 8,85	51,0 $\pm$ 1,20	14,4 $\pm$ 0,57	174 $\pm$ 7,44	1,96 $\pm$ 0,11
Colon descendens gestriipt n = 7	36 $\pm$ 6	106 $\pm$ 14,5	54,2 $\pm$ 2,57	12,7 $\pm$ 0,76	179 $\pm$ 19,7	1,86 $\pm$ 0,17
Colon ascendens gestriipt n = 7	55 $\pm$ 6	133 $\pm$ 11,5	48,6 $\pm$ 1,45	13,1 $\pm$ 0,69	238 $\pm$ 17,8	2,45 $\pm$ 0,22

Tab. 28 Morphometrische Ergebnisse

B : Schichtdicke des subepithelialen Gewebes. in μm (vgl. 3.9.2)
t : Tiefe der Krypten vom Grund der Krypten senkrecht zur Oberfläche gemessen in μm
d : Außendurchmesser der Krypten in μm
l : luminaler Durchmesser der Krypten in μm
 $N_{\text{mm}}^{\text{Kr}2}$: Zahl der Krypten pro 1 mm² makroskopischer Darmsurface
OF : Oberflächenfaktor (vgl. 3.9.2)

4.6.1 Einfluß des Strippens auf die morphometrischen Parameter

Der Vergleich der morphometrischen Daten des intakten und des gestrippten Rectum ergab :

1. Bei einer Schichtdicke des subepithelialen Gewebes von $238 \pm 57 \mu\text{m}$ im intakten und $54 \pm 9 \mu\text{m}$ im gestrippten besaß die abgestrippte Gewebsschicht eine Schichtdicke von $184 \mu\text{m}$ im Rectum.
2. Bei einer Schichtdicke der abgestrippten Gewebsschicht von $184 \mu\text{m}$ und einem Widerstand von $18,5 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (vgl. 4.3.5) besaß das subepitheliale Gewebe am Rectum einen spezifischen Volumenwiderstand von $1005 \Omega \cdot \text{cm}$.
3. Das subepitheliale Gewebe des gestrippten Rectum besaß eine Schichtdicke von $54 \mu\text{m}$. Nimmt man an, daß dieser Anteil des subepithelialen Gewebes im Mittel denselben spezifischen Volumenwiderstand besaß wie die abgestrippte Gewebsschicht, so hatte das subepitheliale Gewebe am gestrippten Rectum einen Anteil von $5,4 \Omega \cdot \text{cm}^2$ am gesamten Serienwiderstand des Rectum.
4. Die Summe der Serienwiderstände der abgestrippten Gewebsschicht ($18,5 \Omega \cdot \text{cm}^2$) und des subepithelialen Gewebes des gestrippten Rectum ($5,4 \Omega \cdot \text{cm}^2$) ergab mit $23,9 \Omega \cdot \text{cm}^2$ nicht den aus der Impedanzmessung am intakten Rectum ausgewerteten Gesamtserienwiderstand von $28,7 \Omega \cdot \text{cm}^2$. Die Differenz von $4,8 \Omega \cdot \text{cm}^2$ kann, entsprechend den in Abb. 9 skizzierten Strukturen, als ein mittlerer Beitrag des zwischen den Krypten liegenden Bindegewebes interpretiert werden.

5. Es wurde untersucht, ob das Strippen einen Einfluß auf die sonst identische Präparation besaß. Denn bei gleicher Zugkraft könnte das gestrippte Darmstück infolge seiner geringeren Wandstärke während der Präparation stärker gedehnt worden sein. Deshalb wurden die Oberflächenparameter (N_{mm}^{Kr2} , OF) des intakten und des gestrippten Rectum mit dem t - Test für abhängige Beobachtungen verglichen :

Rectum	intakt n = 7	gestrippt n = 7	P
N_{mm}^{Kr2}	194 ± 10,7	174 ± 7,44	0,15
OF	2,23 ± 0,15	1,96 ± 0,11	0,17

Tab. 29 Einfluß des Strippens auf die Dehnung des Rectumepithels

N_{mm}^{Kr2} : Zahl der Krypten pro 1 mm² makroskopischer Darmsuperfläche

OF : Oberflächenfaktor (vgl. 3.9.2)

Die Oberflächenparameter unterschieden sich in den beiden Kollektiven nicht signifikant voneinander. Damit war die Forderung, daß sich die beiden Rectumkollektive nur durch das Strippen selbst unterscheiden sollten, erfüllt.

4.6.2 Segmentale Unterschiede der morphometrischen Parameter

Der Vergleich der morphometrischen Meßergebnisse des gestrippten Rectum (Kollektiv 6), des gestrippten Colon descendens (Kollektiv 7) und des gestrippten Colon ascendens (Kollektiv 8) ergab :

1. Die Schichtdicke des subepithelialen Gewebes des gestrippten Rectum betrug $54 \mu\text{m}$, des gestrippten Colon descendens $36 \mu\text{m}$ und des gestrippten Colon ascendens $55 \mu\text{m}$.
2. Legt man den am Rectum gefundenen (vgl. 4.6.1) spezifischen Volumenwiderstand von $1005 \Omega \cdot \text{cm}$ des subepithelialen Gewebes auch dem subepithelialen Gewebe der beiden anderen Segmente zugrunde, ergibt sich ein Widerstand des subepithelialen Gewebes von $5,5 \Omega \cdot \text{cm}^2$ am gestrippten Colon ascendens und von $3,6 \Omega \cdot \text{cm}^2$ am gestrippten Colon descendens.
3. Die Differenz zwischen dem aus dem spezifischen Volumenwiderstand und der Schichtdicke abgeleiteten Widerstand und dem gemessenen Serienwiderstand des subepithelialen Gewebes betrug im Colon ascendens $11,5 \Omega \cdot \text{cm}^2$ und im Colon descendens $13,1 \Omega \cdot \text{cm}^2$. Diese Differenz wurde als mittlerer Beitrag des Bindegewebes zwischen den Krypten zum Serienwiderstand interpretiert.
4. Der Oberflächenfaktor (OF) (vgl. 3.9.2) betrug im Colon ascendens 2,45 , im Colon descendens 1,86 und im Rectum 1,96 (der gestrippten Präparationen). Die Zahl der Krypten pro 1 mm^2 Oberfläche betrug im Colon ascendens 238, im Colon descendens 179 und im Rectum 174 (der gestrippten Präparationen). Während die Zahl der Krypten pro 1 mm^2 Oberfläche im

Colon ascendens größer war als in den beiden anderen Segmenten (t - Test für abhängige Beobachtungen), unterschieden sich die Oberflächenfaktoren (OF) nicht signifikant voneinander.

5 Diskussion

5.1 Einführung

Da die Funktionserhaltungszeit des Dickdarmes der Ratte in vitro in Vorversuchen kurz erschien, wurde eine systematische Verbesserung der experimentellen Methoden (diskutiert in 5.2) vorgenommen. Der Erfolg wurde u.a. durch Messung von Ψ^{ms} in vivo unmittelbar vor Beginn der in vitro - Messung und den Vergleich dieses Wertes mit dem weiteren Verlauf von Ψ^{ms} in vitro kontrolliert. Im Rahmen dieses Vergleiches wird auch der Anschluß von in vitro - an in vivo - Meßwerte am Rectum der Ratte diskutiert (5.3).

In 5.4 wird die Zuordnung der aus den Impedanzmessungen ausgewerteten elektrischen Parameter zu den einzelnen Anteilen der Darmwand diskutiert. Dabei werden die meßtechnischen und inhaltlichen Schwierigkeiten der Auswertung berücksichtigt.

Der Einfluß des Strippens auf die elektrische Impedanz des Rectum wird in 5.5 dargelegt. In Verbindung mit den morphometrischen Resultaten am intakten und gestripten Rectum sind Schlußfolgerungen auf die subepithelialen Gewebswiderstände möglich.

Die Resultate der Impedanzmessung und der Messung von Ψ^{ms} werden im Hinblick auf Aussagen über eine segmentale Heterogenität in 5.6 diskutiert.

Die morphologischen und morphometrischen Ergebnisse (diskutiert in 5.7) dienen dabei schließlich sowohl der Definition der 3 Darmsegmente, an denen elektrisch gemessen wurde, als auch einer Abschätzung der mikroskopisch beurteilbaren Oberflächenparameter.

5.2 Verbesserung der experimentellen Methoden

Experimentelle Untersuchungen am Darm von Ratten waren von jeher durch eine kurze Funktionserhaltszeit des Substrates beeinträchtigt (11). So gaben Edmonds & Marriott 1967 (11) eine Dauer von 10 - 20 min an, in der Ψ^{ms} stabil blieb, und dann eine Dauer von 2 - 3 Stunden, in der Ψ^{ms} gegen 0 mV abfällt. Deshalb wurde in einer Reihe von Vorversuchen durch Modifikation der Versuchslösung und der Begasungseinrichtung sowie durch das Strippen versucht, die Funktionserhaltszeit des Darmes in vitro zu verlängern.

5.2.1 Lösung

Die in dieser Arbeit zunächst für die Kollektive 3 und 4 verwendete Lösung 1 (Tab. 3) enthielt als Substrate Glukose, Lactat und Acetat. Die Metabolisation von Glukose und Lactat war von Windmüller & Späth 1978 (55) für das Jejunum der Ratte nachgewiesen worden. Eine Metabolisation von Glukose und Acetat fanden Frizzell et al. 1974 (17) am Ileum des Kaninchen. Weiterhin hatten Gilman & Kölle 1960 (24) am Ileum der Ratte und Binder & Rawlins 1973 (4) am Colon der Ratte gesichert, daß Glukose als Substrat in vitro metabolisiert wird.

Im weiteren Verlauf der Experimente wurde für die Kollektive 1, 2, 5 - 8 die von Windmüller & Späth 1978 (55) angegebene Originallösung (Lösung 2, Tab. 3) mit den Substraten β -OH-Butyrat, Glutamin, Mannose und Glukose benutzt. Zwar wurde der Einfluß der beiden Lösungen nicht an 2 hinreichend großen Kollektiven untersucht, der Vergleich aller Daten dieser Arbeit legt aber den Schluß nahe, daß ein deutlich unterschiedlicher Effekt der beiden Lösungen auf die

Epithelüberlebenszeit nicht vorhanden war. Diese Aussage ist insbesondere deshalb möglich, weil wenigstens am Rectum, an dem sonst alle Versuche mit Lösung 2 ausgeführt wurden, ein Experiment auch mit Lösung 1 durchgeführt wurde. Der geringe Einfluß unterschiedlich zusammengesetzter Lösungen würde sich insofern in die Literatur einordnen, als auch Edmonds & Marriott 1967 (11) am Colon der Ratte keinen deutlichen Effekt von verschiedenen Substraten (Pyruvat, Succinat, Acetat) auf Ψ^{ms} beobachtet hatten.

5.2.2 Begasung

Die Begasungseinrichtung der Meßkammer wurde zweimal modifiziert. In der ersten Version tauchte in jeder Kammerhälfte ein frei endender Schlauch, aus dem das Gasgemisch ausströmte und nach oben perlte, bis zum Boden der Kammer ein.

In der zweiten Version erfolgte die Begasung der Lösung in einem kleinen "Bubblelift" (Prinzip 3.6.4). In dieser Version waren die "Kamine" nur 8 cm lang.

In der letzten Version, mit der schließlich alle Versuche der Kollektive 1 - 4 durchgeführt wurden, hatten die "Kamine" des "Bubblelift's" eine Länge von 23 cm. Mit dieser Anordnung, die zu einer wesentlich rascheren Strömung der Lösung in der Meßkammer führt und die der gegenwärtig von vielen anderen Autoren z.B. Schultz & Zalusky 1964 (42), Turnheim et al. 1978 (49) verwendeten entspricht, wurde in einer Reihe von Vorversuchen an Darmstücken aus allen 3 untersuchten Darmsegmenten eine deutliche Verlängerung derjenigen Zeit erreicht, während der Ψ^{ms} in vitro hoch blieb. Dieser Befund spricht dafür, daß die Zirkulation der Badlösung und damit vermutlich die Verringerung der

Dicke von "unstirred layers" eine kritische Randbedingung bei in vitro - Versuchen darstellt.

5.2.3 Strippen

Die Sicherung einer adäquaten O_2 - Versorgung bei in vitro - Versuchen am Darm der Ratte ist auch von anderen Autoren bereits als ein zentrales Problem beurteilt worden. Parson & Powis 1971 (36) konnten mit Hilfe einer in vitro - Perfusion der Gefäße aktiven Ionentransport des isolierten Rattencolon bis zu 5 Stunden lang nachweisen. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Herabsetzung der serosalen Diffusionsbarriere auch durch das "Strippen" (vgl. 3.5) eines Großteils des serosalen Bindegewebes erreicht. Die von uns durchgeführte Prozedur entspricht dabei dem "subtotalen Strip" ⁺. Wie später lichtmikroskopisch gezeigt werden konnte, blieb bei allen in dieser Arbeit untersuchten Präparaten die Lamina muscularis tunicae mucosae komplett erhalten und die Trennung erfolgte in der Tela submucosa (vgl. Abb. 9), so wie es in der Literatur beschrieben ist (17).

⁺ subtotaler oder partieller Strip (17)

Technik : Das mit der mucosalen Seite nach unten, unter leichter Längsspannung aufliegende Darmstück wird nach oberflächlichem Einritzen mit einem Skalpell mit der Pinzette gestrippt.

Ergebnis : Die Auftrennung erfolgt in der Tela submucosa (vgl. 3.9.2, Abb. 9).

Alternativ ist in der Literatur auch die Technik des "mucosalen Strip" ⁺ (17) beschrieben, bei der das Bindegewebe vom Epithel noch weitergehend abgetrennt wird, bei der aber die Gefahr der Alteration des Epithels beträchtlich ist.

Der Einfluß des Strippens auf die Funktionserhaltungszeit wurde nun durch den Vergleich eines Kollektivs von intakten (ungestripten) Darmstücken aus dem Rectum (n = 15) mit einem Kollektiv von gestripten Darmstücken aus dem gleichen Segment (n = 18) untersucht. Der Darm der Spendertiere für beide Kollektive war vorher in vivo in gleicher Weise perfundiert worden, und der letzte Wert von Ψ^{ms} in vivo (Ψ_{max}^{ms}) war in beiden Kollektiven nicht signifikant verschieden (4.3.1.1). Die Vorgeschichte der intakten und gestripten Darmstücke für diesen in vitro - Vergleich unterschied sich insofern nur durch die Prozedur des Strippens selbst, was allerdings eine ca. 10 min längere Präparationszeit der gestripten Darmstücke einschloß.

Als wichtigster Parameter für die Beurteilung der Vitalität des Epithels in vitro wurde der Kurzschlußstrom

⁺ mucosaler Strip

Technik : Das mit der serosalen Seite unten, unter leichter Längsspannung aufliegende Darmstück wird nach oberflächlichem Einritzen mit einem Skalpell mit der Pinzette gestriipt.

Ergebnis : Die Auftrennung erfolgt in der Lamina propria tunicae mucosae (vgl. 3.9.2, Abb. 9).

(I_{sc}) angesehen. Er war während der gesamten Versuchsdauer in vitro von 40 min am gestrippten Epithel etwa doppelt so groß wie am intakten (4.3.2 und Abb. 14). Betrachtet man die I_{sc} - Werte des gestrippten Rectum am Ende der 40 min langen in vitro - Meßperiode, die im übrigen dem über weitere 60 min nur langsam abfallenden "Plateau" (vgl. 4.2) entsprach, so würden diese Werte einer Netto - Resorption einwertiger Kationen von ca. $3,8 \mu\text{mol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ entsprechen ⁺. Schultz et al. 1964 (42) haben am Kaninchencolon und Edmonds & Marriott 1968 (11) am Rattencolon gezeigt, daß der Kurzschlußstrom in vitro der Netto - Na - Resorption gleich ist. Ein neuerer Wert von Fromm et al. 1983 (19) von $3,7 \mu\text{mol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ für den Netto - Na - Transport würde daher sehr gut zu dem hier beobachteten I_{sc} - Wert der "Plateauphase" passen.

Obwohl in vitro I_{sc} und ψ^{ms} mit der Zeit abfielen, kann aus der Tatsache, daß die Werte des gestrippten Epithels stets höher lagen als die des ungestrippten und daß der Absolutwert für I_{sc} am Ende der Meßperiode noch die Größenordnung des in vivo gemessenen Netto - Na - Transportes hatte, geschlossen werden, daß das Strippen für die Vitalität des Epithels in vitro einen Vorteil darstellt.

Ein positiver Effekt des Strippens auf die Vitalität von Epithelien in vitro wurde auch von anderen Autoren beobachtet. Field et al. 1971 (15) haben am Ileum des Kaninchens gemessen, daß durch das Strippen der Total-

⁺ Eine genauere Diskussion der Absolutwerte von I_{sc} und ψ^{ms} erfolgt in 5.3 .

widerstand von $89 \Omega \cdot \text{cm}^2$ auf $45 \Omega \cdot \text{cm}^2$ abnahm und I_{sc} in der 30. Minute von $39 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ auf $58 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ angestiegen war. Als Ursache für diesen Effekt vermuten diese Autoren eine relative Hypoxie des ungestrippten Präparates in vitro, die durch das Strippen aufgehoben wird. In Übereinstimmung mit dieser Vorstellung fanden Frizzell et al. 1974 (17) am Ileum der Ratte, daß der O_2 - Verbrauch des gestrippten Epithels im Vergleich zu dem des intakten signifikant erhöht ist. Und schließlich beschrieben Ando & Kobayashi 1978 (1) am Dünndarm des Seewasseraals einen Anstieg von ψ^{ms} des gestrippten Epithels im Vergleich zu dem des ungestrippten in einer "everted sac" - Technik. Auch diese Autoren führen den stimulierenden Effekt des Strippens auf eine verbesserte O_2 - Versorgung elektrogener Transportsysteme zurück.

Am Colon der Ratte haben Binder & Rawlins 1973 () gefunden, daß zwar der Na - Netto - Flux, nicht aber der Kurzschlußstrom nach Strippen signifikant erhöht war. Angesichts der bereits von diesen Autoren geäußerten und durch die Befunde von Fromm & Hegel 1978 (20) gestützten Vermutung, daß im Colon (im Unterschied zum Rectum) der Ratte überwiegend elektroneutrale Transportstellen vorhanden sind, war ein Einfluß des Strippens auf I_{sc} auch nicht zu erwarten. Binder & Rawlins haben jedoch wahrscheinlich gemacht, daß der elektroneutrale Transport im Colon abhängig ist von Glukose im serosalen Medium. Die Erklärung des positiven Effektes des Strippens in der zitierten Arbeit läge demnach bei der verbesserten Substratversorgung des gestrippten Epithels.

White 1977 (53) beschrieb am Dünndarm von Amphiuma und vom Ochsenfrosch einen höheren Kurzschlußstrom am gestrippten als am ungestrippten Epithel. Dieser Autor

erklärte den positiven Effekt des Strippens auf I_{SC} durch den Wegfall des Serienwiderstandes, der im subepithelialen Gewebe lokalisiert ist. Daß dieser meßtechnische Effekt die Zunahme von I_{SC} durch das Strippen bei der Ratte zu ca. 50% ausmachen kann, ist im Anhang der vorliegenden Arbeit (6.1) ausführlicher erläutert. Einen wesentlichen Einfluß des Strippens durch die verbesserte O_2 - Versorgung von der serosalen Seite her konnte White jedoch durch Versuche mit serosaler N_2 - Begasung für diese Kaltblüter - Epithelien ausschließen.

Resümierend lassen sich die eigenen Beobachtungen in die vorstehend zitierten Befunde der Literatur folgendermaßen einordnen :

1. Strippen erhöht generell, sozusagen aus elektrotechnischen Gründen des Meßverfahrens, den Kurzschlußstrom, weil ein Serienwiderstand verringert wird (vgl. 6.1). Dieser Effekt kann unter Zugrundelegung der Zahlenwerte dieser Arbeit etwa die Hälfte der beobachteten I_{SC} - Zunahme erklären.
2. Nach der Literatur ist es wahrscheinlich, daß die O_2 - Versorgung des ungestrippten Epithels im Vergleich zu der des gestrippten schlechter war.
3. Zu der Frage, ob ein verbessertes Substratangebot zu der I_{SC} - Steigerung beigetragen haben könnte, erlaubt die vorliegende Arbeit keine Aussage.

5.3 Anschluß der in vitro - an die in vivo - Daten

Studien des transepithelialen Elektrolyttransportes, gleich an welchem Organ, sind bisher immer entweder am intakten Tier in vivo oder am isolierten Organ in vitro ausgeführt worden ⁺. Der Vergleich von in vivo - mit in vitro - Daten ist daher auch ein prinzipielles Problem der Epithelphysiologie. Merkwürdigerweise sind bisher keine Arbeiten publiziert worden, in denen versucht wurde, in ein und demselben Experiment eine in vivo begonnene Studie in vitro fortzusetzen und dann Aufschluß über die Vereinbarkeit der Meßergebnisse an identisch demselben Präparat unter diesen beiden Versuchsbedingungen zu gewinnen. Es ist aber eine prinzipielle Forderung an jedes in vitro - Experiment, daß die Funktion des in vitro - Präparates seiner in vivo vorhanden gewesenen möglichst genau entsprechen soll.

5.3.1 Wahl der Vergleichsparameter

Für einen solchen in vivo / in vitro - Vergleich an ein und demselben Präparat ist es erforderlich, solche Vergleichsparameter zu wählen, die unter beiden Bedingungen gleich gut meßbar sind und zugleich eine wesentliche Aussage über den jeweiligen Funktionszustand erlauben.

Als ein solcher Parameter bot sich für das Rectum der Ratte die spontane transepitheliale elektrische Span-

⁺ abgesehen von den wenigen Versuchen mit autoperfundierten Organen außerhalb des Organismus (vgl. z.B (5)) oder denen mit Fremdperfusion von Organen, die in situ belassen wurden.

nung (Ψ^{ms}) an. Ψ^{ms} steigt hier in vivo aufgrund einer durch Narkose stimulierten Sekretion von Corticosteroiden (Fromm et al. 1982 (22)), die ihrerseits eine elektrogene Na - Netto - Resorption stimulieren, bei allen Versuchen an (10, 18, 20). Der zuletzt in vivo gemessene Ψ^{ms} - Wert kann als Indikator für die Intensität des elektrogenen Na - Transportes gewertet werden, weil Fromm et al. (19) gezeigt haben, daß Ψ^{ms} mit der Na - Netto - Resorption (J_{Na}^{net}) in vivo korreliert.

5.3.2 Widerstandsmessung in vivo

Eine weitere Größe, die über den Zustand des Epithels Aussagen gestatten könnte, ist der transepitheliale elektrische Widerstand. Dieser Widerstand kann unter Benutzung der Daten dieser Arbeit auf zweierlei Weise errechnet werden.

Erstens kann nach der Beziehung $R = \Psi^{ms} / I_{sc}$ der Wert " R_{JNa} " bestimmt werden, wobei I_{sc} aus J_{Na}^{net} unter open circuit - Bedingungen berechnet wird. Setzt man für Ψ^{ms} den letzten in vivo gemessenen Wert (Tab. 7) = 45 mV und für J_{Na}^{net} den von Fromm et al. (19) bei etwa gleicher transepithelialer elektrischer Spannung gemessenen Wert von $3,7 \mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ ein, so ergibt sich ein R_{JNa} von $450 \Omega \cdot \text{cm}^2$.

Zum zweiten kann der Epithelwiderstand in vivo durch direkte Bestimmung des Quotienten von Spannung und Strom aus einer äußeren Stromquelle bestimmt werden. Dabei wird jedoch immer der Gesamtwiderstand von Epithel und subepitheliale Gewebe (R_t) gemessen. In der Literatur publizierte Werte für R_t am Rattencolon,

die mit DC - (9 , 30) bzw. AC - (29 ⁺) Methoden in vivo direkt gemessen wurden, liegen im Mittel bei ca. 140 $\Omega \cdot \text{cm}^2$.

Gegenwärtig erscheint es unsicher, welchem dieser beiden Werte mehr Gewicht gegeben werden soll :

R_{JNa} könnte durch Gegenwart von anderen elektrogenen Transportkomponenten als $J_{\text{Na}}^{\text{net}}$ verfälscht sein.

R_t könnte infolge von Beschädigungen des Epithels bei der Widerstandsmessung in vivo, eine schlecht definierte Stromverteilung und Probleme der Definition der exponierten Fläche ebenfalls fehlerhaft sein. Die publizierten R_t - Werte sind schon deshalb unsicher, weil in den älteren Untersuchungen (9 , 30) das untersuchte Segment nicht so scharf definiert wurde, wie es angesichts der segmentalen Heterogenität des Widerstandes (vgl. 4.4.2, Tab. 23) erforderlich gewesen wäre.

5.3.3 Zeitgang von I_{SC} und Ψ^{ms} in vitro

Nach Unterbrechung der in vivo - Versuche und Fortsetzung der Experimente in vitro fielen Ψ^{ms} und I_{SC} in charakteristischer Weise zunächst schneller und nach ca. 30 min sehr langsam ab (vgl. Abb. 10). Dabei lassen sich hohe "anfängliche Meßwerte" unmittelbar nach Beginn der in vitro - Messung (7. min) von niedrigeren "Plateaumeßwerten" (36. min) unterschei-

⁺ Die von Krochmann 1978 (29) gemessenen Widerstände sind um ca. 30% nach oben zu korrigieren, weil die dort benutzte Meßfrequenz von 130 Hz gerade etwa der charakteristischen Frequenz des Rectumepithels der Ratte entspricht, wie erst die vorliegende Arbeit gezeigt hat.

den.

Die Anfangswerte von Ψ^{ms} und I_{sc} in vitro wurden an gestrippten Präparaten wegen der zusätzlichen Präparationsarbeit ca. 10 min später als am ungestrippten gemessen. Für beide Kollektive lagen die in vitro - Anfangswerte deutlich unter den letzten in vivo - Werten, allerdings für das intakte mit -44% stärker als für das gestrippte mit -26%. Ohne weitere Information über J_{Na}^{net} bzw. I_{sc} und evt. R_t bzw. R_{JNa} können diese Ψ^{ms} Unterschiede allerdings nicht interpretiert werden.

5.3.4 Widerstandsmessung in vitro

Ein wesentlicher Vorteil der in vitro - Experimente lag in der Möglichkeit der Widerstandsbestimmung an definierter exponierter Epithelfläche mit verschiedenen Methoden :

Erstens konnte $R_{vc} = \Psi^{ms} / I_{sc}^+$ bestimmt werden. R_{vc} zeigte in beiden Präparationen mit einem Anstieg von jeweils etwa 17% bis zur 36. min nur eine geringe Variation. Die Absolutwerte für R_{vc} lagen in der 7.min mit $80 \Omega \cdot cm^2$ im intakten und $108 \Omega \cdot cm^2$ im gestrippten Rectum (unter Verwendung des auf R_s korrigierten Kurzschlußstromes) niedriger als die oben für den in vivo - Zustand zitierten und auch etwas niedriger

⁺ Unter Verwendung des auf R_s korrigierten Kurzschlußstromes sollte R_{vc} dem aus der Impedanzmessung abgeleiteten R_p und bei Verwendung des nicht auf R_s korrigierten Kurzschlußstromes sollte R_{vc} dem aus der Impedanzmessung abgeleiteten R_t äquivalent sein (vgl. 6.1).

als die aus den Impedanzmessungen folgenden R_p - Werte. Interessanterweise lagen die R_{VC} - Werte des Epithels in der intakten Präparation tendenziell etwas niedriger als in der gestrippten.

Zweitens konnte aus den Impedanzmessungen R_t und R_p ausgewertet werden. R_t und R_p zeigten am gestrippten Darmstück ebenfalls mit ca. 16% Anstieg bis zur 36. min nur eine geringe und der der R_{VC} - Werte vergleichbare zeitliche Variation (vgl. Abb. 15 und 16). Am ungestrippten Darmstück dagegen ergab sich im gleichen Zeitraum ein signifikanter Anstieg um 32% für R_t und 38% für R_p . Dieser Unterschied ließe sich dadurch erklären, daß das Epithel des ungestrippten Darmes durch eine ungenügende O_2 - oder Substratversorgung auf der serosalen Seite soweit beeinträchtigt war, daß es zu einer Schwellung der Zellen und damit zum Anstieg des transepithelialen Widerstandes kam.

5.3.5 Vergleich der Absolutwerte der Widerstände

Die Absolutwerte der in vitro ermittelten Widerstände R_t bzw. R_p entsprachen im Rahmen der experimentellen Streuungen an beiden Präparationen denen, die für R_{VC} in vitro errechnet wurden. Damit ergibt sich, daß die in vitro mit verschiedenen Methoden gemessenen Epithelwiderstände des Rectum annähernd zeitunabhängig und unabhängig von der Präparationsmethode gleichgroß, aber niedriger als die oben aus den in vivo - Messungen zitierten waren.

Wegen der Unsicherheit der in vivo - Daten kann jedoch gegenwärtig kein sicherer Schluß etwa auf einen "Sprung" des Widerstandes infolge der Überführung von in vivo nach in vitro gezogen werden. Eine diskontinuierliche Abnahme könnte z.B. durch ungenügende Abdichtung des

Epithels in der in vitro - Meßkammer ("edge damage") vorgetäuscht worden sein. In den hier diskutierten Experimenten gab es keine gezielte Untersuchung des möglichen Einflusses von "edge damage" - Effekten. Die Konstruktion des Epithelcontainers (vgl. 3.6.2) macht eine wesentliche Verfälschung der vorgelegten Daten allerdings unwahrscheinlich, da mit einer vergleichbaren Technik (2 , 25) sehr gute Abdichtung erzielt wurde.

Hinsichtlich des Zeitganges von Ψ^{ms} legen die Daten der vorliegenden Experimente den Schluß nahe, daß das Absinken in den ersten 30 min in vitro weniger auf einer Änderung von R_t bzw. R_p als vielmehr auf einer solchen von I_{sc} beruht haben muß. I_{sc} zeigte in vitro qualitativ den gleichen Zeitgang wie Ψ^{ms} . Die Proportionalität zwischen I_{sc} und Ψ^{ms} während des Experimentes wird dabei durch die geringe zeitliche Variation von R_{vc} bewiesen. Diese Aussagen gelten für gestrippte und intakte Präparationen gleichermaßen mit dem einzigen Unterschied, daß die Absolutwerte der gestrippten Präparationen zu jedem Zeitpunkt signifikant höher waren als die der ungestrippten. Das Diagramm der Abb. 14 zeigt diesen Effekt insofern nur teilweise, als hier der Zeitpunkt t_0 auf der Abszisse den Beginn der in vitro - Messung bezeichnet⁺.

⁺ Tatsächlich waren für das gestrippte Präparat seit seiner Entnahme aus dem in vivo - Versuch immer schon ca. 10 min mehr vergangen als beim ungestrippten, so daß die Kurve des gestrippten Präparates in Abb. 14 im Maßstab der vom in vivo - Experiment her durchlaufenen Zeit um ca. 10 min nach rechts verschoben zu zeichnen wäre.

5.3.6 Absolutwerte für I_{sc} in vitro

Die Absolutwerte von I_{sc} des gestrippten Präparates entsprachen mit $101 \mu A \cdot cm^{-2}$ während der "Plateauphase" (36. min) unter der Annahme, daß $I_{sc} = J_{Na}^{net}$ gilt, einem J_{Na}^{net} von $3,8 \mu mol \cdot h^{-1} \cdot cm^{-2}$ und lagen damit im Bereich des von Fromm et al. (19) für in vivo - Bedingungen angegebenen Zahlenwertes. Gemessen an diesen Zahlen war I_{sc} am Anfang des in vitro - Versuches für beide Präparationen (intakt und gestrippt) unphysiologisch hoch. Eine Klärung dieses merkwürdigen Befundes ist auch deshalb sehr wichtig, weil der Verdacht bestehen kann, daß gerade die hohen "anfänglichen" I_{sc} - Werte die "normalen" waren, die dann successive infolge Verschlechterung der Vitalität des Epithels bis zu den Plateauwerten abgenommen haben könnten.

5.3.7 Initiale Transienten von I_{sc} in vitro

Dafür, daß I_{sc} in der Anfangsphase des in vitro - Versuches anormal hoch gewesen sein könnte (ohne daß die Meßwerte als Artefakte auszuschließen wären), lassen sich folgende Argumente anführen :

Das Strippen wurde im "Trockenen" (d.h. bei nur geringer oberflächlicher Benetzung mit Lösung) bei Zimmertemperatur durchgeführt. Nimmt man einen im Vergleich zum in vivo - Zustand unveränderten Netto - Na - Transport während der Prozedur des Strippens an, so müßte die Na - Konzentration in der noch verbliebenen mucosalen Flüssigkeitsschicht deutlich unter den Halbsättigungswert von $25 mmol \cdot l^{-1}$ (3) abgefallen und dadurch

J_{Na}^{net} behindert worden sein ⁺. Das hätte über eine entsprechende Verminderung des Energieverbrauchs eine Anreicherung energiereicher Substrate (z.B. ATP) zur Folge haben können, die dann nach Herstellung quasi - physiologischer Bedingungen in vitro die beobachtete, vorübergehend überschießende J_{Na}^{net} - Steigerung erklären könnte. Bei diesem Argument müßte angenommen werden, daß entweder die Temperaturabsenkung die ATP - Produktion nicht vergleichbar zur Behinderung von J_{Na}^{net} durch den Konzentrationseffekt reduzierte oder daß der Temperaturabfall jedenfalls die Na - Durchtrittsmechanismen stärker behinderte als die ATP - Bereitstellung. Die vorstehende Argumentation galt für die Bedingungen am gestrippten Präparat. Ein Akzeptieren dieser Erklärung würde zugleich bedeuten, daß die "initialen" Werte für I_{sc} des ungestrippten Präparates als annähernd normal und dessen Plateauwerte als zu niedrig angesehen werden müßten.

Eine weitere Erklärung für zeitweilig überschießende I_{sc} - Werte könnte in der Beobachtung gesehen werden, daß I_{sc} bei in vitro - Versuchen an anderen Epithelien als Reaktion auf erhöhte Dehnung ansteigt (Walser & Butler 1969 (52), Read et al. 1977 (37), Beobachtung-

⁺ Abschätzung : J_{Na}^{net} (in vivo) = $3,7 \mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$,
Na - Konzentration in der Lösung : $140 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$,
Dauer der Präparation : 15 min
Resultat : Während der Dauer der Präparation wird eine $66 \mu\text{m}$ dicke Lösungsschicht auf $\text{Na} = 0 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ leergepumpt. Eine $80 \mu\text{m}$ dicke Schicht würde am Ende der Präparationszeit mit $25 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ gerade die Na - Konzentration aufweisen, die dem Halbsättigungswert für J_{Na}^{net} nach Becker (3) entspricht.

gen an Froschhaut und Kaninchenharnblase (Hegel, persönliche Mitteilung)). Für diese Beobachtungen ist allerdings bisher keine befriedigende Erklärung angegeben worden. Walser & Butler sprechen von organei-genen ("intrinsic") Eigenschaften der Krötenblase, während Read et al. die Stimulation einer elektrogenen Anionensekretion diskutieren.

Diskutiert werden muß auch, ob I_{sc} am Rattenrectum aus mehreren sich teilweise kompensierenden elektrogenen Transportkomponenten gebildet wird. Dann wäre es denkbar, daß durch Überführung von in vivo nach in vitro derjenige Anteil an I_{sc} , der den von J_{Na}^{net} getragenen reduziert, stärker abfällt als J_{Na}^{net} , so daß trotz Abnahme beider Transportkomponenten vorübergehend ein höherer I_{sc} gemessen würde. Ein solcher Effekt würde z.B. bei einer unterschiedlichen Empfindlichkeit der beiden Transportkomponenten gegen ein vermindertes O_2 - oder Substratangebot unter in vitro - Bedingungen zustande kommen. Eine ähnliche Argumentation wurde von Schultz 1981 (39) herangezogen, um das Fehlen einer aktiven Cl - Resorption am ungestrippten Kaninchencolon bei Yorio & Bentley 1977 (57) zu erklären. Gegen dieses Argument spricht, daß dann vermutlich der "initiale" Wert für I_{sc} am ungestrippten Präparat höher als am gestrippten hätte sein müssen, was nicht beobachtet wurde.

Weiterhin haben Edmonds & Marriott 1968 (11) bei in vitro - Messungen an einem nicht genauer definierten Abschnitt des Colon descendens, der den von uns als Rectum bezeichneten Abschnitt einschließt, angegeben, daß der beobachtete I_{sc} ca. 43% größer war als der aus den Na - Flux - Messungen errechnete. Eine zuverlässige Aussage über den Erklärungswert dieser Beobach-

tung wird erst möglich sein, wenn am in vitro - Präparat I_{SC} und alle Fluxe, die I_{SC} erklären, während der "Anfangs" - und "Plateau" - Phase gemessen sind.

Eine Alternative zu der Annahme, daß I_{SC} anfangs anormal hoch war, wäre die Vermutung, daß gerade die "initialen" Werte normal und alle späteren zu niedrig waren. Dies wäre plausibel im Hinblick auf die generell zu erwartende Verschlechterung des Angebotes an O_2 und Substraten unter in vitro - Bedingungen und würde zu der Beobachtung passen, daß I_{SC} des ungestrippten Präparates stets niedriger als des gestrippten war. Hiergegen spricht jedoch der Vergleich der diesen "initialen" I_{SC} -Werten entsprechenden J_{Na}^{net} - Werte mit den von Fromm et al. (19) am gleichen Segment in vivo gemessenen. Die Einschränkung der Gültigkeit dieses Schlusses liegt in der Annahme, daß J_{Na}^{net} in I_{SC} unter beiden Bedingungen aufgeht.

Als letztes ist ein Effekt zu diskutieren, durch den der Bezugspunkt der I_{SC} - Werte verfälscht gewesen sein könnte. Das Verhältnis von makroskopischer zu mikroskopischer Epithelfläche könnte bei der Überführung von in vivo nach in vitro verfälscht worden sein. Ein Einspannen des Präparates in vitro in einem im Vergleich zur in vivo - Geometrie "geschrumpften" Zustand würde in vitro einen höheren I_{SC} - Wert pro Flächeneinheit vortäuschen. Da eine Flächenänderung quadratisch mit der Änderung der Lineardimension einhergeht, hätte bei einem um den Faktor 2,5 zu hohen "initialen" I_{SC} der Fehler in der Lineardimension bei $\sqrt{2,5} = 1,58$ liegen müssen. Die hier ausgeführten Experimente enthalten keine quantitativen Anhaltspunkte zur Frage des Flächenbezuges. Es wurde versucht, den Dehnungszustand des Darmstückes in vitro möglichst genau dem in vivo entsprechen zu lassen. Es liegt auf der Hand, daß dies für das ge-

stripte Darmstück besonders schwierig ist. Subjektiv bestand aber der Eindruck, daß die in vitro - Präparate gegenüber dem in vivo - Zustand eher geschrumpft gewesen sein könnten, als daß sie stärker gedehnt gewesen wären. Insofern kann ein gewisser Beitrag des Flächenbezuges zu I_{sc} - Erhöhungen im gesamten Meßintervall nicht ausgeschlossen werden, wenn auch ein Fehler von mehr als 50% in der Lineardimension als unwahrscheinlich angesehen werden darf.

5.3.8 Zusammenfassung

Entsprechend der vorangegangenen Diskussion sind die Meßwerte für keine der durch die Gleichung $\Psi^{ms} = I_{sc} \cdot R_{vc}$ miteinander verknüpften Größen durch die Experimente dieser Arbeit absolut gesichert. Zusammenfassend ergibt sich folgende Bewertung der relativen Sicherheit der einzelnen Aussagen :

Aus in vitro - Experimenten am Kaninchencolon ist das gleiche Phänomen bekannt, wie es hier am Rattenrectum beobachtet wurde : Überhöhung von I_{sc} am Beginn der in vitro - Messung und spätere Stabilisierung auf einem "Plateauwert" (41 , 48). Da diese Autoren für das Intervall des "Plateaus" physiologische Transportfunktionen annehmen, könnten auch die hier zum Zeitpunkt 36. min (d.h. 51 min nach Entnahme des Präparates aus dem Versuchstier) gemessenen Werte als physiologisch angesehen werden. Angesichts der oben vorgetragenen Argumente (Gleichheit von I_{sc} in vitro und J_{Na}^{net} in vivo, Stimulation des Transportes durch Dehnung und Anhäufung energiereicher Substrate während der Präparation im "trockenen" bei Zimmertemperatur) hat diese Interpretation viel Plausibilität.

Wenn aber I_{sc} im "Plateaubereich" annähernd richtig be-

stimmt wurde, folgt, da Ψ^{ms} experimentell höchstens um ± 1 mV unsicher sein kann und R_{vc} sowie R_t bzw. R_p in vitro im wesentlichen konstant waren, daß R_{vc} und R_t bzw. R_p bei der Überführung des Präparates in die in vitro - Messung sprunghaft abgenommen haben müssen. Die "initialen" Werte von Ψ^{ms} wären dann noch niedriger ausgefallen, wenn I_{sc} nicht, wie oben diskutiert, stimuliert gewesen wäre.

Für die Widerstandsdiskussion bedeutet dies, daß möglicherweise alle bisherigen Widerstandsmessungen in vivo (9 , 29 , 30) zu niedrig ausgefallen sind und der wahre Wert eher in der Nähe von Ψ^{ms} / J_{Na}^{net} anzusetzen wäre.

5.4 Messung der elektrischen Impedanz

5.4.1 Leistungsfähigkeit der elektrischen Impedanzmessung

Die Messung der elektrischen Impedanz von Epithelien besitzt gegenüber der versuchstechnisch einfacheren Messung des Gleichstromwiderstandes folgende Vorzüge:

1. Man erhält einen Wert für den Gleichstromwiderstand der untersuchten Struktur (R_t) als Extrapolationswert aus vielen Messungen zur Frequenz 0 Hz, d.h. ohne störende Polarisationsphänomene.
2. Es besteht die Möglichkeit, mit dem aus der Extrapolation zur Frequenz ∞ abgeleiteten Widerstand denjenigen ohm'schen Widerstand zu bestimmen, der mit allen reaktiven Komponenten in Serie liegt (R_s).
3. Die Differenz $R_t - R_s$ entspricht demjenigen ohm'schen Widerstand, der parallel zu den reaktiven Komponenten der Struktur liegt (R_p).
4. Die Form der an der Struktur erhobenen Ortskurve der Impedanz enthält Informationen über die Zahl der in ihr vorhandenen elektrischen Zeitkonstanten.

5.4.2 Methoden der Bestimmung von elektrischen Impedanzen

Messungen von Impedanzen an biologischen Systemen wurden schon früher und mit sehr verschiedenen Meßapparaturen vorgenommen :

Brown & Castella 1965 (6) benutzten für Messungen an der Froschhaut eine Wheatstone'sche Wechselstrombrücke.

Da es sich bei der Froschhaut um ein vergleichsweise zeitlich stabiles System handelt, war dieses Meßverfahren dort gut anwendbar. Ungünstig ist bei dieser Technik die hohe untere Frequenzgrenze von etwa 50 - 100 Hz, die in den Schwierigkeiten beim Abgleich der Brücke bei niedrigen Frequenzen begründet ist.

Ein anderes Verfahren wurde von Teorell 1946 (47) angewendet. Er fotografierte die Spannungsantwort des Epithels auf einen rechteckförmigen Stromimpuls auf einem Oszillographen und wertete deren zeitlichen Verlauf mit Hilfe einer Zerlegung in Exponentialfunktionen aus. Auf diese Weise erhielt er 5 - 8 Punkte der Impedanzkurve. Begrenzt wurde die Qualität dieses Verfahrens durch die prinzipielle Ungenauigkeit einer graphischen Methode und die geringe Zahl der Impedanzpunkte, die hiermit ermittelt werden können.

Smith 1971 (44) und Schifferdecker & Frömter 1975 (38) verwendeten sinusförmigen Wechselstrom und stellten Strom und zugeordnete Spannungsantwort auf Abzisse und Ordinate eines Speicheroszillographen dar. Die so entstehenden Lissajous - Figuren wurden für jede Frequenz von dem Schirm abfotografiert und daraus die jeweilige Impedanz ausgewertet. Die Aufnahme einer vollständigen Ortskurve der Impedanz mit diesem Verfahren erforderte eine Meßzeit von ca. 10 - 25 min, setzte also ebenfalls ein relativ stabiles biologisches System voraus. Ein Vorteil bestand darin, daß die untere Frequenzgrenze mit 0,05 - 1 Hz sehr niedrig gewählt werden konnte.

Die von uns angewandte Methode der Messung der elektrischen Impedanz mit Hilfe eines Systems aus 2 Lock - in - Verstärkern (27) ermöglichte bei einer Meßzeit von ca. 3 min (2) eine Erfassung von 10 - 12 Impedanz-

punkten in einem Frequenzbereich von 3 Hz bis 10 kHz. Die Übereinstimmung der mit dem Look - in - Verfahren ermittelten Werte mit Meßwerten, die mit Hilfe von Labormesßbrücken an den isolierten Komponenten gewonnen waren, betrug bei einer an einem elektrischen Ersatzschaltkreis durchgeführten Probemessung (3) für R_p und R_s 1% und für C_p 6% . Abgesehen von den vergleichsweise kurzen Meßzeiten ist die hier verwendete Methode den zuvor genannten aber vor allem auch in der Auswertung der primären Meßdaten und deren Interpretation überlegen, da hier die Meßwerte unmittelbar vom Rechner übernommen werden und dann mit Hilfe verschiedener Programme korrigiert, ausgewertet und in lesbarer Form ausgegeben werden können. Einzelheiten der Durchführung und Auswertung von elektrischen Impedanzmessungen an einem lebenden Epithel und die hier dazu verwendete Apparatur wurden bereits in einer vorangegangenen Dissertation aus der gleichen Arbeitsgruppe dargestellt (Beck 1980 (3)).

5.4.3 Interpretation der elektrischen Impedanzmessungen mit Hilfe elektrisch äquivalenter Schaltkreise

Während die Auswertung von R_p und R_s als Schnittpunkte der Ortskurve der Impedanz mit der reellen Achse modellunabhängig ist, erfordert die Analyse der Form der Impedanzkurve eine Interpretation der Meßdaten durch eine analytische Funktion, die ihrerseits aus der Annahme eines elektrisch äquivalenten Schaltkreises abgeleitet wird. Solange die Impedanzkurven durch einen einfachen Halbkreis gut angenähert werden können, erscheint die Interpretation durch ein einfaches RC - Glied (R = "Epithelwiderstand", C = "Epithelkapazität") angemessen, da dessen Ortskurve der Impedanz gerade ein Halbkreis ist.

Allerdings gilt dieses nicht mehr, wenn der Mittelpunkt des an die Meßdaten bestangepaßten Halbkreises, wie von uns am Dickdarm der Ratte erhoben (vgl. Abb. 11 und 12), in den 1. Quadranten des Kartesischen Koordinatensystems verschoben ist (Winkel α). Wie von Cole & Cole (vgl. Schwan 1957 (43)) gezeigt wurde, führt die Beteiligung von mehr als einer Zeitkonstanten ⁺ an der Impedanz eines RC - Netzwerkes zu Mittelpunktverschiebungen eines an die Impedanzwerte angepaßten Halbkreises.

Im vorliegenden Fall eines einschichtigen Epithels folgt aus der histologisch bekannten Struktur, daß mindestens ⁺⁺ die beiden Zeitkonstanten der apikalen und der basolateralen Membran von Bedeutung sein müssen, entsprechend dem Schema der Abb. 26 :

⁺ Von Cole & Cole 1941 (7) wurden Verteilungen von Zeitkonstanten untersucht.

⁺⁺ Zu denken wäre weiterhin an eine horizontale Distribution von Zeitkonstanten, z.B. infolge des Vorkommens zweier verschiedener Zelltypen (Zylinderzellen und Becherzellen) im Darm.

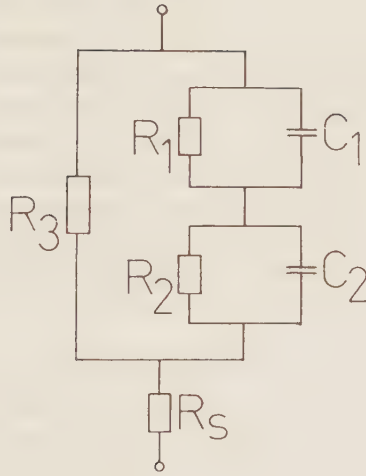


Abb. 26 Elektrischer Ersatzschaltkreis für Impedanzmessungen
an Epithelien (6 - Parameter - Modell)

- R_1 : paralleler Widerstand des 1. RC - Gliedes (z.B. apikale Zellmembran)
 C_1 : parallele Kapazität des 1. RC - Gliedes (z.B. apikale Zellmembran)
 R_2 : paralleler Widerstand des 2. RC - Gliedes (z.B. basolaterale Zellmembran)
 C_2 : parallele Kapazität des 2. RC - Gliedes (z.B. basolaterale Zellmembran)
 R_3 : parallel zu den beiden RC - Gliedern gelegener Widerstand (z.B. Zwischenzellräume)
 R_S : zu den beiden RC - Gliedern in Serie gelegener Widerstand (z.B. subepitheliales Gewebe)

Die Tab. 18 und 27 zeigen, daß der Winkel α in den vorliegenden Experimenten zwar $\neq 0$, aber annähernd zeitunabhängig und im intakten und gestrippten Rectum gleich groß war. Dieser Befund paßt zu der Interpretation, daß die reaktiven Eigenschaften der untersuchten Präparate allein im Epithel liegen, und bedeutet, daß der Unterschied zwischen den (mindestens) 2 Zeitkonstanten durch das Strippen nicht beeinflusst wurde. An den beiden Colonsegmenten waren die Werte für den Winkel α kleiner als im Rectum (vgl. Tab. 27). Dies könnte andeuten, daß die Verteilung der Zeitkonstanten in beiden Segmenten verschieden ist.

Die Tatsache, daß für alle hier am Dickdarm der Ratte erhobenen Impedanzmessungen der Winkel $\alpha \neq 0$ war, bedeutet zugleich, daß die aus dem Impedanz - Halbkreis ausgewerteten "apparenten Größen" R_p und C_p keine direkte Aussage über elektrische Eigenschaften der zugrunde liegenden Epithelstrukturen erlauben. Dazu wäre eine explizite Bestimmung aller im Ersatzschaltkreis Abb. 26 enthaltenen Parameter erforderlich gewesen, was mit dem hier verwendeten transepithelialen Meßverfahren prinzipiell nicht möglich ist, weil die Zahl der unabhängigen Meßgrößen kleiner als die Zahl der zu bestimmenden Parameter war. Ohne intrazelluläre Ableitung durch Punktion der Epithelzelle mit einer Mikroelektrode bleibt der elektrische Ersatzschaltkreis in Abb. 26 unterbestimmt. Die apparente Größe C_p entspricht daher auch nicht unmittelbar den beteiligten Membrankapazitäten. Weil C_p von allen elektrischen Systemparametern abhängt, sagt sein Absolutwert auch nichts über absolute spezifische Membrankapazitäten

aus ⁺ .

Publizierte C_p - Werte sehr verschiedener Epithelien betragen meist ein Mehrfaches der allgemein als spezifische Zellmembrankapazität angesehenen Größe von ca. $1 \mu F \cdot cm^{-2}$. Dies hat in früheren Arbeiten anderer Autoren (vgl. Übersicht Hegel 1977 (26)) zu Spekulationen über "Flächenfaktoren" > 1 für die Epithelzellmembranen geführt, was entsprechend der Einsicht in den "apparenten Charakter" dieser Größe in vielen Fällen fragwürdig ist.

Es bleibt noch die Frage, ob C_p wenigstens als Vergleichsparameter für die relative Epithelkapazität bei verschiedenen Dehnungszuständen des Epithels (z.B. bei stärkerer Dehnung des gestrippten gegenüber dem ungestrippten Rectum) brauchbar sein könnte. Diese Frage ist eher zu verneinen. Eine stärkere Querdehnung z.B. der gestrippten gegenüber der ungestrippten Präparation hätte sicherlich die Membrankapazitäten verkleinert. Daneben wäre aber auch eine Änderung der ohm'schen Widerstandskomponenten des Epithels eingetreten. Eine Konstanz der ohm'schen Widerstandsanteile ist jedoch Voraussetzung, um aus der Änderung der apparenten Größe C_p auf eine Änderung der Epithelkapazität schließen zu können. So kann z.B. eine zeitliche Änderung der ohm'schen Widerstände des Epithels (R_1 , R_2 und R_3 in Abb. 26) eine Änderung der apparenten Größe C_p bewirken, während sich die

⁺ Eine ausführliche formale und quantitative Untersuchung des Aussagewertes von Impedanzkurven an Epithelien befindet sich in Vorbereitung (Weskamp 1983).

Epithelkapazitäten zur gleichen Zeit nicht verändert zu haben brauchen. So ist dann die von Lewis & Diamond 1976 (31) angegebene Korrektur von Meßgrößen auf die effektive Oberfläche des Epithels mit Hilfe der ausgewerteten Kapazität nicht schlüssig an einem nicht "ideal dichten" Epithel.

Im Prinzip die gleiche Argumentation wie für C_p gilt auch für die ebenfalls apparente Größe R_p . Allerdings hat R_p im Falle von $f = 0$ Hz die klare Bedeutung des apparenten ohm'schen Widerstandes des Epithels, der der Parallelschaltung des parazellulären mit dem transzellulären Leitungsweg entspricht. Ohne weitere Meßmethoden ist jedoch auch hier eine Bestimmung der Anteile der einzelnen Strukturelemente des Epithels an R_p nicht möglich.

Es sind 2 Sonderfälle denkbar, in denen eine Analyse des elektrischen Ersatzschaltkreises in Abb. 26 doch allein mit Hilfe der transepithelialen Messungen möglich wird :

1. Wenn der Widerstand der Parazellularwege (R_3) sehr klein ist gegenüber R_1 und R_2 . In diesem Fall addieren sich die Kehrwerte von C_1 und C_2 zum Kehrwert einer virtuellen Kapazität C_3 . Dies ermöglicht die Überführung der Ersatzschaltung Abb. 26 in die Ersatzschaltung Abb. 7 (3 - Parameter - Modell). Dabei entspricht R_3 dann R_p , C_3 entspricht C_p und R_s bleibt R_s . Eine Differenzierung von C_1 und C_2 bleibt allerdings unmöglich. Dieser erste Sonderfall trifft nur für sehr "durchlässige" ("leaky") Epithelien wie z.B. die Necturus - Gallenblase in ausreichender Näherung zu, nicht jedoch für den Dickdarm der Ratte.

2. Wenn der Widerstand der Parazellularwege (R_3) sehr groß ist gegenüber R_1 und R_2 (d.h. wenn ein "ideal dichtes" Epithel vorliegt) und wenn zusätzlich die beiden Zeitkonstanten der apikalen und der basolateralen Zellmembran deutlich verschieden (ca. Faktor 10, vgl. Smith 1971 (44)) sind. Dann kann die Ortskurve der Impedanz die Auswertung der deutlich getrennten Anteile der beteiligten Zeitkonstanten zulassen.

Beide Sonderfälle trafen jedoch für das Dickdarmepithel der Ratte nicht zu, da die gemessenen Impedanzpunkte (vgl. Abb. 11 und 12) keine Andeutung zweier Maxima erkennen ließen und außerdem der Mittelpunkt der angepaßten Halbkreise in den ersten Quadranten verschoben war.

5.4.4 Bedeutung der Impedanzmessung am Dickdarm der Ratte

Der Aussagewert der Impedanztechnik, wie sie in dieser Arbeit angewendet wurde, lag deshalb vor allem in der Möglichkeit der Differenzierung von R_t in R_p und R_s .

Die Beobachtung des Verhaltens von R_t , R_p und R_s unter dem Einfluß des Strippens zeigte, daß, während R_p praktisch unbeeinflußt blieb, R_s deutlich abnahm (vgl. Tab. 12 und 14). Mit Hilfe der Morphometrie (s.u.) konnte gezeigt werden, daß die prozentuale Abnahme der Schichtdicke des subepithelialen Gewebes beim Strippen der prozentualen Abnahme von R_s entsprach. Durch diese Messungen konnte zweierlei gezeigt werden :

1. R_s ist nur im subepithelialen Gewebe lokalisiert.
2. Die reaktiven Eigenschaften der Darmwand der Ratte

sind ausschließlich im Epithel selbst (in der Lamina epithelialis tunicae mucosae) lokalisiert.

Das Impedanzverfahren ermöglicht also auf elektrischem Wege eine Erfassung der für alle epithelphysiologischen Untersuchungen wesentlichen Größe R_p , die sonst nur nach im Einzelfall oft problematischer präparativer Abtrennung des Epithels von seinen tragenden Strukturen zugänglich ist.

Die hier erhaltenen Absolutwerte für R_p von etwa $120 \Omega \cdot \text{cm}^2$ weisen die Rectummucosa in vitro bereits als ein Epithel mit "mittlerer" elektrischer Leitfähigkeit aus. Unter Berücksichtigung des aus der morphometrischen Analyse abgeleiteten Oberflächenfaktors von ca. 2 ergäbe sich ein in vitro - Epithelwiderstand von ca. $240 \Omega \cdot \text{cm}^2$. Dabei besteht die Möglichkeit, daß der Epithelwiderstand in vivo noch höher lag (vgl. 5.3.2 und 5.3.8). Der hier angegebene Wert ist jedenfalls beim Vergleich mit Literaturwerten noch um R_s (ca. $30 \Omega \cdot \text{cm}^2$) zu erhöhen - eine Korrektur, die bisher nicht möglich war. Dementsprechend wäre also die Rectummucosa bereits als ein Epithel mit "geringer" elektrischer Leitfähigkeit einzustufen.

Inwieweit die elektrische Leitfähigkeit als Kriterium für eine Klassifizierung der Epithelien in "dichte" ("tight") und "durchlässige" ("leaky") (vgl. Frömter & Diamond 1972 (23)) ausreicht, ist derzeit in der Diskussion (vgl. Schultz 1972 (40)). Tatsache ist, daß das Rectum sowohl im Hinblick auf die hohen spontanen transepithelialen elektrischen Spannungen (12) als auch in Hinblick auf die hohen Salzgradienten (33) als "dichtes" Epithel einzustufen ist. Der elektrische Epithelwiderstand fügt sich zwar in das Bild ein, erscheint aber, gemessen an anderen "dichten" Epithelien wie Froschhaut oder Krötenblase, eher gering.

5.5 Das Strippen

Neben der Verbesserung der Vitalität des Epithels in vitro durch eine erleichterte serosale Sauerstoff- und Substratversorgung sollte das "Strippen" einer weiteren Differenzierung des Totalwiderstandes der Darmwand (R_t) dienen und Hinweise auf die den ausgewerteten Widerstandsanteilen zugrundeliegenden Epithelstrukturen liefern.

Durch das Strippen wurde ein großer Teil des subepithelialen Gewebes entfernt, während die Epithelschicht intakt blieb (vgl. 5.7). Dadurch wurde der Serienwiderstand des Rectum von $28,7 \Omega \cdot \text{cm}^2$ auf $10,2 \Omega \cdot \text{cm}^2$ reduziert, während der Parallelwiderstand unbeeinflusst blieb (vgl. 4.3.4 und 4.3.5). Die prozentuale Abnahme des Serienwiderstandes durch das Strippen steht dabei mit 64% in guter Übereinstimmung zur 77%igen⁺ Reduktion der subepithelialen Gewebsschichtdicke (B). Mit Hilfe des Strippens konnte also aus den Auswertungen der Morphometrie und der Impedanzmessungen gezeigt werden, daß R_p den Widerstand des Epithels und R_s den Widerstand des subepithelialen Gewebes bezeichnet und R_t als Summe von R_p und R_s den Widerstand der kompletten Darmwand.

Demnach setzt sich die Darmwand des Rattendickdarmes mit einem ohm'schen Widerstand (R_t) von $124 \Omega \cdot \text{cm}^2$

⁺ Dabei ist zu berücksichtigen, daß ein Teil des subepithelialen Gewebes bei der Ausmessung nicht berücksichtigt wurde (das zwischen den Krypten gelegene Bindegewebe, vgl. 3.9.2), sodaß die Angabe von 77% leicht nach unten zu korrigieren ist.

aus der Epithelschicht mit einem Widerstand von 96 bzw. 101 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ und dem subepithelialen Gewebe mit einem Widerstand von 28 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ zusammen. Diese Werte gelten für den Beginn des in vitro - Versuches, in dessen Verlauf R_p , vielleicht infolge von Zellschwellung, leicht ansteigt (s.u.).

Bei jeder experimentellen Untersuchung, die sich der Kurzschlußstrommessung bedient, ist eine genaue Kenntnis aller mit dem transportierenden Epithel in Serie liegenden Widerstände deshalb von Bedeutung, weil der gemessene Kurzschlußstrom den wahren um den Faktor $R_t / R_t - R_s$ (vgl. 6.1) unterschätzt. Dieser schon von anderen Autoren (46) diskutierte (vgl. 5.2.3), aber bisher nicht quantifizierbare Einfluß des subepithelialen Gewebes konnte hier erstmals für den Dickdarm der Ratte angegeben werden (vgl. 6.1). Der Korrekturfaktor, um den der tatsächliche Kurzschlußstrom gegenüber dem gemessenen unterschätzt wird, betrug im gestrippten Rectum 1,08 und im intakten 1,24 . Dieser meßtechnische Effekt kann den höheren Kurzschlußstrom des gestrippten gegenüber dem intakten Rectum etwa zur Hälfte erklären (vgl. 6.1).

Die Absolutwerte und der Zeitgang von Ψ^{ms} und I_{sc} des intakten und gestrippten Rectum sind in 5.2 und 5.3 diskutiert.

Im Absolutwert und Zeitgang von R_t spiegelt sich im wesentlichen das Verhalten von R_p wieder, da R_s zeitlich konstant und in seinem Absolutwert erheblich kleiner war.

Der Parallelwiderstand zeigte während der Dauer des in vitro - Versuches eine Zunahme, die im intakten Rectum

stärker ausgeprägt war als im gestrippten. R_p ist in dem einem Epithel angemessenen Modell (vgl. Abb. 26) als epithelialer Widerstand durch eine Parallelschaltung des transzellulären ($R_1 + R_2$) und des parazellulären (R_3) Leitungsweges bedingt. Im Laufe des in vitro - Versuches nahm der Betrag dieses Parallelwiderstandes im intakten Rectum um 38% und im gestrippten um 17% zu. Eine Erklärung könnte in einer durch Substrat- oder Sauerstoffmangel unter der in vitro - Bedingung bedingten Zellschwellung der Zellen der Epithelschicht bestehen, die z.B. den Querschnitt und damit die Leitfähigkeit der Interzellularspalten vermindert haben könnte. Dies würde auch die stärkere Zunahme von R_p im intakten Rectum erklären, da hier möglicherweise die Substrat- und Sauerstoffversorgung stärker limitiert war als in der gestrippten Präparation. Nimmt man eine präparationsbedingt stärkere Dehnung des gestrippten gegenüber dem intakten Rectum von ca. 10% an (nach der Morphometrie, vgl. 5.7), so wäre ein 10% größerer Parallelwiderstand der gestrippten Präparation zu erwarten gewesen. Daß nur ein Unterschied von 5% beobachtet wurde, mag auf einer schon in der 7. min des in vitro - Versuches stärker ausgeprägten Zellschwellung im intakten gegenüber dem gestrippten Rectum beruht haben.

Auch andere Autoren haben den Einfluß des Strippons auf den Widerstand des Darmes experimentell untersucht. So gaben Field et al. (15) eine Reduktion des Widerstandes der Darmwand durch das Strippen am Ileum des Kaninchens von $89 \Omega \cdot \text{cm}^2$ auf $45 \Omega \cdot \text{cm}^2$ an. White (53) fand am Dünndarm von Amphiuma eine Verminderung des Widerstandes durch das Strippen von $150 \Omega \cdot \text{cm}^2$ auf $110 \Omega \cdot \text{cm}^2$ und am Dünndarm des Ochsenfrosches von $170 \Omega \cdot \text{cm}^2$ auf $80 \Omega \cdot \text{cm}^2$. Während der subepitheliale Gewebswiderstand durch dieselbe Stripptechnik, wie von uns verwendet, am Dünndarm von Amphiuma etwa doppelt so stark wie an der Ratte vermin-

dert wurde, war die Widerstandabnahme am Ochsenfroschdünndarm sogar 4mal so groß. Aus diesen Zahlen ergibt sich, daß die durch das Strippen erreichbare Widerstandsabnahme an einem speziellen Epithel stark vom gewählten Substrat abhängt.

5.6 Segmentale Heterogenität der elektrischen Meßparameter

Die Frage nach einer segmentalen Heterogenität des elektrischen Widerstandes am Dickdarm der Ratte wurde durch den Nachweis segmentaler Unterschiede von Ψ^{ms} , des Na - Influx und der Wirkung von Amilorid (3 , 20) angeregt. Die Entscheidung, den elektrischen Widerstand des Darmes in vitro zu untersuchen, wurde nicht nur wegen der prinzipiellen Bedeutung von in vitro - Experimenten für die Epithelforschung getroffen und weil hier an einer definierten Darmwandfläche gemessen werden konnte, sondern auch, weil die Gefahr, beim Plazieren einer intraluminalen Elektrode in vivo das Epithel zu verletzen, als größer erachtet wurde als die Gefahr eines Randschadens in vitro ("edge damage").

Für den epithelialen elektrischen Widerstand wurde eine segmentale Heterogenität insofern nachgewiesen als R_p mit $118 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (36. min) im Rectum 2,5mal so groß war wie zur gleichen Zeit in den beiden Colonsegmenten (Colon ascendens : $42,1 \Omega \cdot \text{cm}^2$, Colon descendens : $41,6 \Omega \cdot \text{cm}^2$). Demnach wären die beiden Colonsegmente im Vergleich zum Rectum als "weniger dichte" Epithelien einzustufen. Dieser Befund paßt zu der generellen Systematik, daß die Epithelleitfähigkeit mit den Netto - Transportraten korreliert.

Der Widerstand der subepithelialen Gewebsschichten der Darmwand (R_s) betrug im Colon ascendens $17 \Omega \cdot \text{cm}^2$, im Colon descendens $17 \Omega \cdot \text{cm}^2$ und im Rectum $10 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (jeweils zeitliches Mittel des in vitro - Versuches

an gestrippter Präparation). Die Ursache für den größeren Restwiderstand nach dem Strippen in den beiden Colonsegmenten könnte in der Anatomie der drei Darmabschnitte zu suchen sein. So könnte z.B. im Colon ascendens das wegen der sehr tiefen Krypten auch sehr breite Bindegewebe zwischen den Krypten einen Beitrag zu R_s leisten, der durch das Strippen nicht beeinflußt wird. Somit besaß das subepitheliale Gewebe auch nach dem Strippen noch einen erheblichen Anteil am Gesamtwiderstand der Darmwand. Dies war mit 28% (Anteil von R_s an R_t) im Colon ascendens und mit 29% im Colon descendens in den beiden Colonsegmenten stärker ausgeprägt als mit 8% im Rectum. Die Messung des Kurzschlußstromes ohne Korrektur auf den Serienwiderstand des subepithelialen Gewebes würde also den wahren Kurzschlußstrom in den beiden Colonsegmenten wesentlich stärker unterschätzen als im Rectum.

Zahlenwerte für den elektrischen Widerstand, die spontane transepitheliale elektrische Spannung und den Kurzschlußstrom am Dickdarm der Ratte in vitro sind bereits auch von anderen Autoren publiziert worden. In Tab. 30 sind diese Daten zusammen mit den eigenen Meßwerten der 36. min aufgeführt :

Autor	Segment	ge- striipt	ψ^{ms} in mV +	R_t in $\Omega \cdot cm^2$	I_{sc}^{-2} in $\mu A \cdot cm^2$
Binder & Rawlins 1973 (4)	"Colon"	*	-	-	32
Dharmasathaphorn et al. 1980 (8)	"Colon"	*	-3,1	69	45
Edmonds & Marriott 1968 (11)	<u>Colon ascendens</u> normal	*	-11,7	159	74
	Na-verarmt	*	-12,7	134	94
	<u>Colon descendens</u> normal	*	-15,0	147	102
	Na-verarmt	*	-28	119	235
Edmonds & Nielson 1968 (14)	"Colon"	*	-9,3	-	-
Freel et al. 1980 (16)	"Colon"	*	-7,5	86	96
Nell 1977 (34)	Colon descendens	*	-7,8	106	77
Stoebel & Goldner 1973 (45)	Colon descendens	*	-	-	18,4

Will et al. 1980 (54)	Colon ascendens normal		-2,6	53	50
	akut Na-verarmt		-5,0	73	68
	chronisch Na-verarmt		-2,0	31	70
	Colon descendens normal		-4,9	83	62
	akut Na-verarmt		-8,4	85	100
	chronisch Na-verarmt		-22,1	63	422
Yau & Makhlouf 1975 (56)	Colon ascendens	*	-4,1	-	-
	Colon descendens	*	-5,1	-	-
eigene Daten 1982	Colon ascendens	*	-4,2	56	-
	Colon descendens	*	-0,9	57	-
	Rectum	*	-13,7	144	101

Tab.30 Literatur - Übersicht der elektrischen Meßwerte am Dickdarm der Ratte in vitro

+ Lumen stets negativ

Der entscheidende Grund, der uns veranlaßt hat, eine weitere Messung des Widerstandes vorzunehmen, besteht darin, daß, bevor von Fromm & Hegel (20) und von Becker (3) ein segmentaler Unterschied für Ψ^{ms} und andere funktionelle Parameter des Dickdarmepithels aufgezeigt wurde, der Lokalisation des Versuchspräparates keine Beachtung geschenkt wurde. So wurde das von uns als Rectum bezeichnete Segment von den meisten Autoren nicht als eigenständiges Segment geführt, sondern dem Colon descendens subsumiert. Andere Autoren (4 , 8 , 14 , 16) geben gar keine Lokalisation innerhalb des Dickdarmes für den Entnahmeort ihrer Versuchspräparate an. Fehler entstehen dabei vor allem dadurch, daß Versuchspräparate aus dem Rectum dem Colon descendens zugeordnet werden und deshalb für das Colon descendens falsch zu hohe Werte für Ψ^{ms} , R_t und I_{sc} angegeben werden. Dies könnte z.B. die auch im Vergleich zu den anderen Autoren überhöhten Meßwerte von Edmonds & Marriott 1968 (11) am Colon descendens (Na-verarmter Tiere) erklären.

Für die Unterschiede unserer Daten zu den in der Literatur publizierten stehen weiterhin folgende Faktoren als Ursachen zur Diskussion :

1. Der Stimulationszustand des Epithels durch Corticosteroide ist nach jetziger Einsicht nicht ausreichend in jedem Einzelfall bekannt gewesen. So wird die Corticosteroidsekretion nicht nur durch den Na - Gehalt der Nahrung, sondern auch durch Narkose und die Operationstechnik (22) beeinflußt.
2. Die Dauer der Präparation zwischen dem Unterbrechen der Blutversorgung bei der Entnahme des Darmstückes aus dem Versuchstier und dem Einbringen des Präparates in die Meßkammer in vitro ist in den bisherigen Arbeiten nicht mitgeteilt. Die Dauer der Präparation könnte aber, wie

in 5.3.7 diskutiert, die initialen Meßwerte für I_{sc} und Ψ^{ms} erheblich beeinflussen.

3. Der Meßzeitpunkt innerhalb des in vitro - Versuches, zu dem die publizierten Daten erhoben wurden, ist nicht mit ausreichender Genauigkeit mitgeteilt. So lassen sich (vgl. 5.3.3) grundsätzlich hohe "initiale" und niedrigere "Plateau" - Werte für Ψ^{ms} und I_{sc} unterscheiden. Entsprechend den hier als "physiologisch" angesehenen "Plateau" - Werten würden sofort nach Beginn des in vitro - Versuches erhobene Meßwerte zu hoch ausfallen. Aber diese Einschätzung kann gegenwärtig nicht als im strengen Sinne gesichert angesehen werden (vgl. 5.3.7).
4. Es ist bisher in keiner Arbeit gelungen, die in der Meßkammer in vitro exponierte Epithelfläche mit ausreichender Genauigkeit zu standardisieren. Zwar liegt die sog. exponierte Darmwandfläche zwischen den beiden Kammerhälften als Kontaktfläche der Kammerhälften fest, dennoch kann die effektive Epithelfläche durch unterschiedlich starke Dehnung bei der Präparation außerordentlich verschieden sein. Während Ψ^{ms} vom Dehnungszustand des Epithels in der Meßkammer unbeeinflusst bleibt, wird I_{sc} durch eine stärkere Dehnung in dem Maße abnehmen wie der Widerstand zunimmt. So könnte z.B. der im Vergleich zu den Meßwerten der anderen Autoren von Will et al. 1980 (54) am Colon descendens chronisch Na - verarmter Tiere zu hoch gemessene I_{sc} und zu niedrig gemessene R_t (unter der Annahme, daß auch hier Darmstücke aus dem Rectum fälschlicherweise dem Colon descendens zugeordnet wurden, was wegen der Höhe von Ψ^{ms} zu vermuten ist (18)), damit erklärt werden, daß das Epithel in einem vergleichsweise weniger stark gedehnten Zustand in die Meßkammer eingespannt wurde.

5. Die gemessenen Kurzschlußströme sind nicht von allen Autoren auf die zum transportierenden Epithel in Serie liegenden Widerstände korrigiert worden. Von einigen Autoren ist nicht einmal auf den Widerstand der Badlösung korrigiert worden. Eine Nichtberücksichtigung des Badwiderstandes wird ebenso zu einer Unterschätzung des tatsächlichen I_{sc} führen, wie eine Messung ohne Korrektur an einer ungestrippten Präparation den Kurzschlußstrom in noch höherem Maße unterschätzt als an einer gestrippten Präparation.
6. Die Temperatur der Lösung in der Meßkammer betrug nicht bei allen Autoren 37°C. So haben Edmonds & Marriott 1968 (11) die meisten Messungen bei 22°C durchgeführt. Unter diesen Bedingungen wird ein im Vergleich zur Messung bei 37°C zu hoher Widerstand und nach der RGT - Regel ein zu kleiner Kurzschlußstrom gemessen.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß in der vorliegenden Arbeit eine segmentale Heterogenität auch für den elektrischen Widerstand aufgezeigt werden konnte. Nach den oben diskutierten Vorbehalten gegen die bisher publizierten Daten sind die Absolutwerte dieser Arbeit mit dem Stand der Literatur vereinbar.

5.7 Diskussion der morphometrischen Ergebnisse

Eine histologische Aufarbeitung und Auswertung der Morphometrie wurde von uns im Anschluß an die elektrischen Messungen an Präparaten vorgenommen, die nach ihrer Herkunft und Präparation denjenigen vergleichbar waren, an denen vorher elektrisch gemessen wurde. Ziel dieser Untersuchungen war, Hinweise für die Klärung folgender Fragestellungen zu erhalten :

1. Lassen sich die Darmsegmente, an denen in dieser Arbeit gemessen wurde, histologisch definieren? Der Lokalisation des Segmentes, an dem gemessen wurde, kommt, nachdem in dieser Arbeit eine segmentale Heterogenität des Widerstandes des Rattendickdarmes nachgewiesen wurde, beim Vergleich mit in der Literatur veröffentlichten elektrophysiologischen Daten sicherlich eine zentrale Bedeutung zu. Dazu wurden die eigenen Befunde mit der bisher detailliertesten Untersuchung über anatomische Hinweise auf eine segmentale Heterogenität von Lindström et al. 1979 (32) verglichen.
2. Kann mit Hilfe der Morphometrie und der Messung der elektrischen Impedanz am intakten und gestrippten Präparat auch bei Verwendung eines transzellulären Meßverfahrens Aufschluß über den Anteil einzelner Darmwandstrukturen am Gesamtwiderstand gewonnen werden? Diese Frage ist zum größten Teil schon in 5.4.4 und 5.5 diskutiert und positiv beantwortet worden.
3. Läßt sich die effektive Epithelfläche des Darmes abschätzen und damit ein genauer Flächenbezug der elektrischen Meßparameter herstellen? Diesem Bestreben waren von vornherein insofern Grenzen gesetzt, als sich eine Oberflächenvergrößerung durch Mikrovilli nicht lichtmikroskopisch nachweisen läßt und

der Dehnungszustand der makroskopischen Darmwand in vivo oder in der Meßkammer im Rahmen dieser Arbeit nicht definiert werden konnte.

Aus der hier durchgeführten histologischen Auswertung (vgl. 4.5) geht hervor, daß, während das Colon ascendens durch die Dichte seines Kryptenbesatzes, die Tiefe seiner Krypten und die zur Basis der Krypten zunehmende Dichte der Becherzellen gut abgrenzbar ist, eine Unterscheidung von Rectum und Colon descendens morphologisch nicht gelingt. Vielleicht ist darin ein Grund zu sehen, daß von vielen Autoren (11 , 54 , 56) früher zwischen den von uns als Rectum und Colon descendens bezeichneten Darmsegmenten nicht unterschieden wurde, sondern beide Segmente als "Colon descendens" bezeichnet wurden.

Insofern stimmen unsere Befunde mit denen von Lindström et al. 1979 (32) überein, die ebenfalls keinen morphologischen Unterschied von Rectum und Colon descendens finden konnten. Lindström et al. untergliedern den 21 - 27 cm langen Dickdarm der Ratte in 5 Segmente. Das Caecum (5 - 7 cm lang), das proximale Colon (5,5 - 6,5 cm lang), die große Flexur (3 - 3,5 cm lang), das distale Colon (4,5 - 6,5 cm lang) und das Rectum (3 - 3,5 cm lang). Das hier in dieser Arbeit als Colon ascendens bezeichnete Segment (vgl. Tab. 1) entspricht dabei in der Nomenklatur von Lindström et al. dem proximalen Colon, das Colon descendens dieser Arbeit Lindström's distalem Colon. Das hier als Rectum definierte Segment wird von Lindström et al. ebenfalls dem distalen Colon zugeordnet. Dabei stimmen die bei Lindström et al. und in dieser Arbeit für die jeweiligen Darmsegmente angegebenen morphologischen Kriterien gut überein. Unbefriedigend bleibt lediglich die aus elektrophysiologischer und funktioneller Sicht bei

Lindström et al. zu weit distal angesetzte Grenze von Rectum und distalem Colon, insbesondere weil diese Autoren diese Grenze nur rein makroskopisch - anatomisch definieren. Unter Berücksichtigung der elektrischen Messungen wäre die Grenze von Rectum und Colon descendens also weiter proximal (mindestens 4,5 cm proximal des Anus) anzusetzen. Zusammenfassend bleibt also festzustellen, daß eine Definition aller Darmsegmente allein mit Hilfe der Histologie nicht möglich ist, daß aber die Zuordnung eines untersuchten Dickdarmsegmentes z.B. entsprechend der Untergliederung von Lindström et al. mit Hilfe der Längenangaben (s.o.) eine Grundvoraussetzung für die Vergleichbarkeit von Daten aus verschiedenen Laboratorien ist.

Mit Hilfe der Morphometrie konnte nachgewiesen werden, daß R_s der Widerstand des subepithelialen Gewebes ist (diskutiert in 5.4 und 5.5). Aus dem Serienwiderstand der abgestrippten Gewebsschicht konnte der spezifische Volumenwiderstand des subepithelialen Gewebes errechnet werden. Er hatte mit $1005 \Omega \cdot \text{cm}$ (vgl. 4.6.1) etwa den 20fachen Wert, den die hier benutzte Badlösung bei einer Temperatur von 37°C besitzt. Auf Grund der Kenntnis des spezifischen Volumenwiderstandes des subepithelialen Gewebes und der morphometrischen Daten konnte weiterhin gezeigt werden, daß auch das zwischen den Krypten gelegene Bindegewebe zum Serienwiderstand beiträgt (vgl. 4.6.1 und 4.6.2).

Von besonderer Bedeutung beim morphologischen Vergleich der intakten und der gestrippten Präparation am Rectum war die Überlegung, daß die gestrippten Präparate infolge ihrer geringen Wandstärke bei gleicher Präparation vielleicht in einem stärker gedehnten Zustand in die Meßkammer eingespannt worden sein könnten als die intakten. Dadurch wäre der Kurzschlußstrom im gestripp-

ten Präparat zu niedrig und der Widerstand zu hoch gemessen worden. Mit Hilfe der Morphometrie (Zahl der Krypten pro 1 mm^2 makroskopischer Darmwandoberfläche) läßt sich nunmehr abschätzen, daß dieser Effekt im intakten Rectum zur Exposition einer um 11% größeren Epithelfläche auf der gleichen makroskopischen Darmwandoberfläche geführt hat als im gestrippten Rectum. Der Kurzschlußstrom wäre demnach in der gestrippten Präparation beim Vergleich mit der intakten entsprechend nach oben zu korrigieren, so daß sich der positive Einfluß des Strippens auf die Vitalität des Darmes in vitro als noch größer darstellen würde. Auf eine Korrektur aller in dieser Arbeit publizierten elektrischen Meßwerte bezüglich dieses Dehnungseffektes wurde verzichtet, weil der Unterschied des Vergleichsparameters ($N_{\text{mm}}^{\text{Kr}}$) zwischen der intakten und der gestrippten Präparation nicht signifikant war.

Weiterhin ließ sich aus der morphometrischen Untersuchung Aufschluß über die Oberflächenfaktoren der einzelnen Segmente gewinnen, d.h. über die Oberflächenvergrößerung der makroskopischen Darmwandoberfläche durch Krypten. So betragen die Oberflächenfaktoren im Rectum und Colon descendens etwa jeweils 1,9 und im Colon ascendens 2,5. Während der höhere Epithelwiderstand des Rectum im Vergleich zum Colon descendens nicht durch eine lichtmikroskopisch sichtbare Oberflächenvergrößerung des Colon descendens erklärt werden kann, trägt der höhere Oberflächenfaktor im Colon ascendens zumindest teilweise zum niedrigeren Epithelwiderstand bei, ohne daß jedoch der Unterschied damit vollständig erklärt wäre.

Es bleibt jetzt noch die Frage, wie genau die morphometrischen Untersuchungen waren und welche Fehlerquellen dabei bestanden. Beim Ausmessen der Darmwandstruk-

turen wirkte sich weniger die Meßgenauigkeit des Fadenmikrometers limitierend auf die Qualität der Meßwerte aus, als vielmehr die Schwierigkeit der Festlegung der Grenzen der jeweiligen Struktur. So bestand bei der Messung der intraluminalen (l) und der Gesamtkryptendicke (d) z.B. die Schwierigkeit, daß ein zentraler Schnitt durch die Krypte ausgemessen werden sollte, daß man einer Krypte aber nicht ansah, ob der histologische Schnitt die Krypte zentral durchschnitt oder als Sekante traf. Es wurden deshalb jeweils die dicksten Krypten im Schnitt zur Bestimmung von l und d herangezogen. Damit besteht natürlich die Gefahr, daß die durchschnittlichen Kryptendicken (l und d) überschätzt wurden, vor allem, wenn die Kryptendicke im Präparat sehr inhomogen gewesen wäre. Eine starke Inhomogenität der Kryptendicke konnte jedoch, sooft ein Präparat tangential angeschnitten war, nicht festgestellt werden.

Für die Bestimmung von N_{mm}^{Kr2} ist vor allem die Frage von Bedeutung, wieviel der Krypte bei einem nur peripheren Anschnitt derselben mindestens in dem $10\ \mu m$ dicken Schnitt vorhanden sein mußte, damit die Krypte unter dem Mikroskop erkennbar wurde. Es wurde angenommen, daß dazu mindestens $2,5\ \mu m$ des $10\ \mu m$ dicken Schnittes erforderlich waren ⁺. Aus dieser Annahme resultiert die Zahl der Schnitte, in denen ein und dieselbe Krypte gesehen wird, mit im Mittel $\frac{d + 5\ \mu m}{10\ \mu m}$ (vgl. 3.9.2).

⁺ Der Gefahr, daß ein und dieselbe Krypte durch vertikalen Verlauf zur Schnittebene in weit mehr als nur $\frac{d + 5\ \mu m}{10\ \mu m}$ Schnitten zu erkennen ist, wurde begegnet, indem nur die Mündungen der Krypten an die Oberfläche gezählt wurden.

Zusammenfassend ist über die Methode der Morphometrie zu sagen, daß die Ergebnisse neben ihrem Wert als relatives Maß z.B. beim Vergleich der gestriipten mit der intakten Präparation auch als Absolutwerte ein ausreichendes Maß an Zuverlässigkeit besitzen.

6. Anhang

6.1 Einfluß von mit dem Epithel in Serie liegenden Widerständen auf die Messung des Kurzschlußstromes

Der Kurzschlußstrom (I_{sc}) ist die Meßgröße für den rheogenen Transport eines Epithels. Dazu wird ein Gleichstrom von genau der Größe durch das Epithel geleitet, daß die elektrische Spannung über dem Epithel 0 mV beträgt. In diesem Fall sind der elektrogene Transport des Epithels und der applizierte Gleichstrom dem Betrag nach gleich, und die Messung der Stromstärke des Gleichstromes liefert uns den Betrag des elektrogenen Transportes.

Für das "Voltage - clamp" - Gerät in unserem Versuchsaufbau war der Kurzschlußfall nun gegeben, wenn die Spannung zwischen den beiden Spannungselektroden 0 mV betrug. Da sich die Spannungselektroden aber nicht an den Grenzen des Epithels befanden, sondern jeweils durch eine 4 mm starke Lösungsschicht von ihnen getrennt waren, wurde die Spannung im "Kurzschlußfall" nicht über dem Epithel auf 0 mV "eingestellt", sondern fiel erst über den zusätzlichen Widerstand der 8 mm starken Lösungsschicht (R_{Bad}) auf 0 mV ab. Der applizierte Gleichstrom und damit der gemessene Kurzschlußstrom war also im "Kurzschlußfall" kleiner als der elektrogene Transport des Epithels und unterschätzte diesen um den Faktor : $R_{gesamt} / R_{Darmwand}$. Dabei bezeichnet $R_{Darmwand}$ den Widerstand der Darmwand und R_{gesamt} ($= R_{Darmwand} + R_{Bad}$) den Gesamtwiderstand zwischen den beiden Spannungselektroden. Jeder von uns gemessene und in dieser Arbeit zitierte Meßwert für I_{sc} wurde, ohne daß dies noch einmal bei den Meßwerten angemerkt ist, auf den aktuell vor jedem Versuch gemessenen Widerstand der Lösung zwischen den Spannungselektroden (R_{Bad}) korri-

giert (vgl. 3.6.8).

Die Auswertung der Messung der elektrischen Impedanz erlaubte es uns nun, zwischen dem Widerstand des transportierenden Epithels (R_p) und dem Widerstand des subepithelialen Gewebes (R_s) zu diskriminieren (vgl. 5.5). So lag also während der Kurzschlußstrommessung neben R_{Bad} mit R_s noch ein weiterer Widerstand in Serie zum transportierenden Epithel. Der tatsächliche elektrogene Transport wird also vom gemessenen Kurzschlußstrom sogar um den Faktor $R_{gesamt} / R_{Epithel}$ unterschätzt. Die adäquate Korrektur zur Erfassung des elektrogenen Transportes müßte also erfolgen nach :

$$I_{sc}(\text{wahr}) = I_{sc}(\text{gemessen}) \cdot \frac{R_{Epithel} + R_s + R_{Bad}}{R_{Epithel}}$$

$I_{sc}(\text{wahr})$: Der bezüglich des Badwiderstandes (R_{Bad}) und des Widerstandes des subepithelialen Gewebes (R_s) korrigierte Kurzschlußstrom.

$I_{sc}(\text{gemessen})$: Der nach 3.6.7 (bei Spannung 0 mV zwischen den Spannungselektroden) gemessene Kurzschlußstrom.

R_s : Der Widerstand des in Serie zum transportierenden Epithel gelegenen subepithelialen Gewebes (ergibt sich aus der Auswertung der Impedanzmessungen (vgl.5.4.4)

R_{Bad} : Widerstand der Lösung zwischen den Spannungselektroden in der Meßkammer, der aktuell vor jedem Versuch bestimmt wurde.

$R_{Epithel}$: Der Widerstand der transportierenden Epithelschicht. Ergibt sich nach :

$$R_{Epithel} = R_{gesamt} - R_s - R_{Bad}$$

R_{gesamt} : Gesamtwiderstand aller Strukturen zwischen den Spannungselektroden (bei in die Kammer eingespanntem Darmstück). Ergibt sich nach : $\Psi^{ms} / I_{sc}(\text{gemessen})$.

Ψ^{ms} : Spontane transepitheliale elektrische Spannung unter "open-circuit" - Bedingungen.

Auf eine Korrektur jedes in dieser Arbeit aufgeführten Kurzschlußstrommeßwertes auf R_s a priori wurde verzichtet, um eine Vergleichbarkeit mit in der Literatur angegebenen Meßwerten zu ermöglichen. Ohne Kenntnis der Größe von R_s war eine Korrektur bisher ja nicht möglich.

Beim Strippen wird nun aber ein Teil des subepithelialen Gewebes entfernt. Damit wird R_s im Vergleich zur ungestrippten Präparation reduziert. Ein am gestrippten Präparat gemessener Kurzschlußstrom wird also den tatsächlichen elektrogenen Transport weniger stark unterschätzen als ein am intakten Präparat gemessener. Anders gesagt wird also (ohne Korrektur auf R_s) allein das Strippen den Kurzschlußstrom sozusagen aus meßtechnischen Gründen erhöhen, ohne daß sich der elektrogene Transport dabei verändert hat. Es ist also beim Vergleich mit Literaturangaben wichtig zu wissen, ob ein in der Literatur zitierter Meßwert am intakten oder gestrippten Präparat erhoben wurde. Um den Einfluß dieses meßtechnischen Effektes in seiner Größenordnung einmal ermessen zu können, wurden die gemessenen und die bezüglich R_s korrigierten Daten für das Rectum der Ratte nebeneinander in Tab. 31 aufgelistet (auf R_{Bad} sind alle Werte korrigiert) :

t	Kurzschlußstrom in $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ (nur bezüglich R_{Bad} korrigiert)		Kurzschlußstrom in $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ (bezüglich R_{Bad} und R_s korrigiert)	
	intaktes Rectum n=15	gestripptes Rectum n=18	intaktes Rectum n=15	gestripptes Rectum n=18
7. min	145 $\pm$ 20,1	258 $\pm$ 33,9	187 $\pm$ 29,7	280 $\pm$ 35,2
14. min	94,1 $\pm$ 15,2	199 $\pm$ 27,7	116 $\pm$ 20,8	217 $\pm$ 29,2
26. min	64,1 $\pm$ 10,4	129 $\pm$ 23,7	78,2 $\pm$ 15,9	140 $\pm$ 24,9
36. min	52,5 $\pm$ 9,53	101 $\pm$ 19,8	64,7 $\pm$ 14,1	108 $\pm$ 20,6

Tab. 31 Vergleich der gemessenen mit den bezüglich R_s korrigierten Kurzschlußströmen des intakten und gestrippten Rectum

t : Zeit in min nach Füllung der Kammer mit Lösung

Während der gemessene Kurzschlußstrom im gestrippten Rectum 96% größer war als im intakten, war der auf R_s korrigierte im gestrippten Präparat durchschnittlich (unter Berücksichtigung aller 4 Meßzeitpunkte) nur noch 52% größer als im intakten.

Resümierend läßt sich also feststellen, daß der positive Effekt des Strippens am Rectum der Ratte etwa zur Hälfte infolge einer fehlenden Korrektur auf R_s rein meßtechnischer Natur und zur anderen Hälfte auf die Überlegenheit der gestrippten gegenüber der ungestrippten Präparation zurückzuführen war (vgl. 5.2).

Je nach dem Verhältnis der Widerstände R_s , R_{Epithel} und R_{Bad} zueinander kann der Grad, in dem der tatsächliche elektrogene Transport unterschätzt wird, gering sein (wie z.B. bei der Harnblase des Kaninchens oder der Froschhaut) oder erheblich (am ungestrippten Dickdarm der Ratte).

7 Zusammenfassung

Der elektrische Widerstand des Dickdarmepithels der Ratte wurde in vitro mit einer Wechselstromtechnik gemessen. Der Funktionszustand der untersuchten Präparate wurde vor Entnahme aus dem Tier durch 7 - stündiges Registrieren der spontanen transepithelialen elektrischen Spannung (Ψ^{ms}) in vivo und nach Entnahme durch fortlaufend gemessene Werte für Ψ^{ms} und den Kurzschlußstrom (I_{sc}) beurteilt. Dadurch ergab sich die Möglichkeit eines Vergleiches von in vivo - mit in vitro - Daten desselben Präparates.

Vorversuche zeigten, daß die Zusammensetzung der in vitro benutzten Badlösung nicht kritisch war, daß aber die Qualität der Begasung der Lösung in der Meßkammer eine kritische Randbedingung für die in vitro - Versuche darstellte.

In einer methodischen Untersuchung über den Einfluß des "Strippens" auf die Vitalität des in vitro - Präparates wurde gezeigt, daß ein teilweise vom subepithelialen Gewebe befreites ("gestripptes") Epithel höhere Werte für Ψ^{ms} und I_{sc} hervorbringt als ein ungestripptes. Trotzdem konnten die in vivo zuletzt gemessenen Werte für Ψ^{ms} auch an gestrippten Präparaten in vitro nicht aufrecht erhalten werden. Das Ergebnis der Diskussion legt nahe, daß beim Übergang von in vivo nach in vitro möglicherweise gleichzeitig 2 Prozesse stattfinden : eine transiente Stimulation des rheogenen transepithelialen Transportes und eine diskontinuierliche Abnahme des elektrischen Widerstandes.

Die Technik der Wechselstrommessung erlaubte die Differenzierung des Totalwiderstandes (R_t) in einen zu den reaktiven Komponenten der Darmwand parallel liegenden

(R_p) und einen in Serie liegenden Widerstand (R_s). Mit Hilfe der Stripptechnik und der Morphometrie konnte nachgewiesen werden, daß R_p der ohm'sche Widerstand des Epithels und R_s der Widerstand des subepithelialen Gewebes der Darmwand ist.

Für den Widerstand des Epithels (R_p) wurde eine segmentale Heterogenität am Dickdarm der Ratte aufgezeigt. R_p war mit $118 \Omega \cdot \text{cm}^2$ am Rectum 2,8mal so groß wie am Colon descendens ($42 \Omega \cdot \text{cm}^2$) und Colon ascendens ($42 \Omega \cdot \text{cm}^2$). Der Widerstand des subepithelialen Gewebes der Darmwand (R_s) betrug im intakten Rectum $29 \Omega \cdot \text{cm}^2$ und im gestrippten $10 \Omega \cdot \text{cm}^2$. Die Reduktion von R_s durch das Strippen steht dabei in guter Übereinstimmung zur morphometrisch nachgewiesenen Reduktion der Schichtdicke des subepithelialen Gewebes. Der spezifische Volumenwiderstand des subepithelialen Gewebes des Rectum konnte daraus mit $1005 \Omega \cdot \text{cm}$ errechnet werden.

Mit Hilfe der Morphometrie wurde eine Oberflächenvergrößerung des Rectum und des Colon descendens um den Faktor 1,9 und des Colon ascendens um den Faktor 2,5 durch Krypten gefunden. Unter Berücksichtigung dieser Oberflächenvergrößerung betragen die Epithelwiderstände des Colon ascendens $103 \Omega \cdot \text{cm}^2$, des Colon descendens $78 \Omega \cdot \text{cm}^2$ und des Rectum $231 \Omega \cdot \text{cm}^2$ oder unter Einbeziehung von R_s (für Vergleiche mit der Literatur) $137 \Omega \cdot \text{cm}^2$ im Colon ascendens, $106 \Omega \cdot \text{cm}^2$ im Colon descendens und $251 \Omega \cdot \text{cm}^2$ im Rectum. Dieser Epithelwiderstand klassifiziert das Rectum zwar als Epithel mit "mittlerer" elektrischer Leitfähigkeit, ist aber, gemessen an den beobachteten Werten für Ψ^{ms} und transepithelialen Salzgradienten, erstaunlich niedrig.

Die mit der Wechselstromtechnik mögliche Auftrennung von R_t in $R_p + R_s$ erlaubte erstmals die Bestimmung des Korrekturfaktors R_t / R_p , mit dem der gemessene Kurzschlußstrom multipliziert werden muß, um den Fehler, der beim Kurzschließen durch die Anwesenheit von R_s entsteht, zu korrigieren. Dieser Faktor beträgt für das ungestrippte Rectumepithel der Ratte 1,23 und für das gestrippte immerhin noch 1,07 .

8 Literaturverzeichnis

- 1 ANDO,M., KOBAYASHI,M. : Effects of Stripping of the Outer Layers of the Eel Intestine on Salt and Water Transport. Comp. Bioch. Physiol. 61, 497-501, 1978
- 2 BECK,H. : Der Einfluß von Trypsin auf die Impedanz des Gallenblasenepithels von Necturus maculosus. Dissertation Berlin, 1980
- 3 BECKER,R. : Untersuchungen zum apikalen Na - Einstrom in die Epithelzellen des Dickdarmes der Ratte. Dissertation Berlin, 1981
- 4 BINDER,H.J., RAWLINS,C.L. : Electrolyte Transport across Isolated Large Intestinal Mucosa. Am. J. Physiol. 225, 1232-1239; 1973
- 5 BOULPAEP,E.L., SEELY,J.F. : Electrophysiology of Proximal and Distal Tubules in the Autoperfused Dog Kidney. Am. J. Physiol. 221, 1084-1096, 1971
- 6 BROWN,A.C., KASTELLA,K.G. : The AC Impedance of Frog Skin and its Relation to Active Transport. Biophys. J. 5, 591-606, 1965
- 7 COLE,S., COLE,H. : Dispersion and Absorption in Dielectrics. J. of Chemical Physics 9, 341-351, 1941
- 8 DHARMSATHAPHORN,K., RACUSEN,L., DOBBINS,J.W. : Effect of Somatostatin on Ion Transport in the Rat. J. Clin. Invest. 66, 813-820, 1980

- 9 DOLMAN,D., EDMONDS,C.J., SALAS-COLL,C. : Effect of Aldosterone on Lithium Permeability of Rat Colon Mucosa. J. Endocr. 70, 135-140, 1976
- 10 EDMONDS,C.J., MARRIOTT,J.M. : The Effect of Aldosterone and Adrenectomy on the Potential Difference of Rat Colon and on the Transport of Sodium, Potassium, Chloride and Bicarbonate. J. Endocr. 39, 517-531, 1967
- 11 EDMONDS,C.J., MARRIOTT,J.M. : Electrical Potential and Short-Circuit Current of an in Vitro Preparation of Rat Colon Mucosa. J. Physiol. 194, 479-494, 1968
- 12 EDMONDS,C.J., MARRIOTT,J.M. : Factors Influencing the Electrical Potential across the Mucosa of Rat Colon. J. Physiol. 194, 457-478, 1968
- 13 EDMONDS,C.J., MARRIOTT,J.M. : The Effect of Aldosterone on the Electrical Activity of Rat Colon. J. Endocr. 44, 363-377, 1969
- 14 EDMONDS,C.J., NIELSON,O.E. : Transmembrane Electrical Potential Differences and Ionic Composition of Mucosal Cells of the Rat Colon. Acta Physiol. Scand. 72, 338-349, 1968
- 15 FIELD,M., FROMM,D., MC COLL,I. : Ion Transport in Rabbit Ileal Mucosa. 1. Na and Cl Fluxes and I_{sc} . Am. J. Physiol. 220, 1388-1396, 1971
- 16 FREEL,W.F., HATCH,M., EARNEST,D.L., GOLDNER,A.M. : Oxalate Transport across the Isolated Rat Colon. Bioch. et Biophys. Acta 600, 838-843, 1980

- 17 FRIZZELL, R.A., MARKSCHEID-KASPI, L., SCHULTZ, S.G. : Oxidative Metabolism of Rabbit Ileal Mucosa. Am. J. Physiol. 226, 1142-1148, 1974
- 18 FROMM, M. : Longitudinale Heterogenität des epithelialen Transportes am Dickdarm der Ratte. Dissertation Berlin, 1978
- 19 FROMM, M. et al. : In Vorbereitung
- 20 FROMM, M., HEGEL, U. : Segmental Heterogeneity of Epithelial Transport in Rat Large Intestine. Pflügers Arch. 378, 71-83, 1978
- 21 FROMM, M., HEGEL, U., BECK, H., WESKAMP, P. : Effect of Trypsin on DC and AC Parameters of Necturus Gallbladder. Proc. Int. Union Physiol. Sci. 27, 244, 1977
- 22 FROMM, M., ÖLKERS, W., HEGEL, U. : Time Course of Aldosterone and Corticosterone Plasma Levels in Rats during General Anaesthesia, Surgery and Experimentation. In Vorbereitung
- 23 FRÖMTER, E., DIAMOND, J. : Route of Passive Ion Permeation in Epithelia. Nature New Biology 235, 9-13, 1972
- 24 GILMAN, A., KOELLE, E.S. : Substrate Requirements for Ion Transport by Rat Intestine Studied in Vitro. Am. J. Physiol. 199, 1025-1029, 1960
- 25 GOEGELEIN, H. : Fluctuation Analysis and Impedance Measurements in the Gallbladder Epithelium. Dissertation Leuven, 1980

- 26 HEGEL,U. : AC Analysis of Transporting Epithelia. In: Siegenthaler,W., Beckerhoff,R., Vetter,W. (eds.) : Diuretics in Research and Clinics. G. Thieme, Stuttgart, 21-29, 1977
- 27 HEGEL,U., BOULPAEP,E.L. : Studies of Electrical Impedance of Kidney Proximal Tubular Epithelium in Necturus. Proc. of VIth Int. Congr. Neph., Florence, 1975
- 28 KAHLE,W., LEONHARDT,H., PLATZER,W. : Taschenatlas der Anatomie. G. Thieme, Stuttgart, Band 2, 204, 1975
- 29 KROCHMANN,K. : In vivo Experimente zur Aufklärung des Entstehungsmechanismus der transepithelialen elektrischen Potentialdifferenz am Rectumepithel der Ratte. Dissertation Berlin, 1978
- 30 LEVENS,N.R., MUNDAY,K.A., YORK,B. : Effect of Angiotensin II on Fluid Transport, Transmural Potential Difference and Resistance in the Rat Colon in Vivo. J. Endocr. 67, 64-65, 1975
- 31 LEWIS,S.A., DIAMOND,J.M. : Na Transport by Rabbit Urinary Bladder a Tight Epithelium. J. Membrane Biol. 28, 1-40, 1976
- 32 LINDSTRÖM,C.G., ROSENGREEN,J.-E., FORK,F.-T. : Colon of the Rat. Acta Radiologica Diagnosis 20, 523-536, 1979
- 33 LÜCKHOFF,A., HORSTER,M. : Hydraulic Permeability Coefficient and Sodium Steady - State Luminal Concentration of the in Vivo Perfused Rat Distal Colon. Pflügers Arch. 391, 301-305, 1981

- 34 NELL,G. : Elektrogener und elektroneutraler Na - Transport am Rattendarm. Analyse der gegenseitigen Abhängigkeit mit Hilfe von Inhibitoren. Habilitationsschrift Homburg / Saar, 1977
- 35 NELLANS,H.N., FRIZZELL,R.A., SCHULTZ,S.G. : Brush - Border Processes and Transepithelial Na and Cl Transport by Rabbit Ileum. Am. J. Physiol. 226, 1131-1141, 1974
- 36 PARSON,D.S., POWIS,G. : Some Properties of a Preparation of Rat Colon Perfused in Vitro through the Vascular Bed. J. Physiol. 217, 641-663, 1971
- 37 READ,N.W., SMALLWOOD,R.H., LEVIN,R.J., HOLDSWORTH,C.D., BROWN,B.H. : Relationship between Changes in Intraluminal Pressure and Transmural Potential Difference in the Human and Canine Jejunum in Vivo. Gut 18, 141-151, 1977
- 38 SCHIFFERDECKER,E., FRÖMTER,E. : Impedance Measurements on Necturus Gallbladder. Pfügers Arch. 359, R 126, 1975
- 39 SCHULTZ,S.G. : Ion Transport by Mammalian Large Intestine. In: Johnson,L.R. (ed.) : Physiology of the Gastrointestinal Tract. Raven Press, New York, 1981
- 40 SCHULTZ,S.G. : Electrical Potential Differences and Electromotive Forces in Epithelial Tissues. J. Gen. Physiol. 59, 794-798, 1972
- 41 SCHULTZ,S.G., FRIZZELL,R.A., FROMM,M. : Unveröffentlichte Beobachtungen

- 42 SCHULTZ, S.G., ZALUSKY, R. : Ion Transport in Isolated Rabbit Ileum. I. Short Circuit Current and Na Fluxes. J. of Gen. Physiol. 47, 567-584, 1964

- 43 SCHWAN, H.P. : Electrical Properties of Tissue and Cell Suspensions. In: Lawrence, J.H., Tobias, C.A. (eds.) : Advances in Electrical and Medical Physics. 5, 148-209, Academic Press, New York, 1957

- 44 SMITH, P.G. : The Low Frequency Electrical Impedance of Isolated Frog Skin. Acta Physiol. Scand. 81, 355-366, 1971

- 45 STOEDEL, D.P., GOLDNER, A.M. : Ion Transport across the Rat Colon. Am. J. Physiol. 225, 1332, 1973

- 46 TAI, Y.-H., TAI, C.-Y. : The Conventional Short - Circuiting Technique Under - Short - Circuits Most Epithelia. J. Membrane Biol. 59, 173-177, 1981

- 47 TEORELL, T. : Application of "Square Wave Analysis" to Bioelectric Studies. Acta Physiol. Scand. 12, 235-253, 1946

- 48 THOMPSON, M., SUZUKI, Y., SCHULTZ, S.G. : The Electrophysiology of Rabbit Descending Colon. J. Membrane Biol. 66, 41-54, 1982

- 49 THURNHEIM, K., FRIZZELL, R.A., SCHULTZ, S.G. : Interaction between Cell Sodium and the Amiloride - Sensitive Sodium Entry Step in Rabbit Colon. J. Membrane Biol. 39, 233-256, 1978

- 50 TURNHEIM,K., FRIZZELL,R.A., SCHULTZ,S.G. : Effect of Anions on Amiloride - Sensitive, Active Sodium Transport across Rabbit Colon in Vitro. J. Membrane Biol. 37, 63-84, 1977
- 51 USSING,H.H., ZERAHN,K. : Active Transport of Sodium as the Source of Electric Current in the Short - Circuit Isolated Frog Skin. Acta Physiol. Scand. 23, 110-127, 1950
- 52 WALSER,M., BUTLER,S.E., HAMMOND,V. : Reversible Stimulation of Sodium Transport in the Toad Bladder by Stretch. J. of Clin. Invest. 48, 1714-1723, 1969
- 53 WHITE,J.F. : Alterations in Electrophysiology of Isolated Amphibian Small Intestine Produced by Removing the Muscle Layers. Biochem. et Biophys. Acta 467, 91-102, 1977
- 54 WILL,P.C., LEBOWITZ,J.L., HOPFER,U. : Induction of Amiloride - Sensitive Sodium Transport in the Rat Colon by Mineralocorticoids. Am. J. Physiol. 238, 261-268, 1980
- 55 WINDMÜLLER,H.G., SPÄTH,A.E. : Identification of Ketone Bodies and Glutamine as the Major Respiratory Fuels in Vivo for Postabsorptive Rat Small Intestine. J. of Biol. Chemistry 253, 69-76, 1978
- 56 YAU,W.M., MAKHLOUF,G.M. : Comparison of Transport Mechanisms in Isolated Ascending and Descending Rat Colon. Am. J. Physiol. 228, 191-195, 1975
- 57 YORIO,T., BENTLEY,P.J. : Permeability of the Rabbit Colon in Vitro. Am. J. Physiol. 232, 5-9, 1977

9. Lebenslauf

Am 9.10.1957 wurde ich, Jörg - Dieter Schulzke, als einziger Sohn des Arztes Dr. med. Bodo Schulzke und seiner Ehefrau, der Lehrerin Helga Schulzke, geborene Reichert, in Berlin geboren. Nach vierjährigem Besuch der 2. Grundschule in Berlin - Steglitz wechselte ich 1968 in das altsprachliche Gymnasium Steglitz, das ich am 18.6.1976 mit der allgemeinen Hochschulreife verließ. Das Studium der Medizin habe ich an der Freien Universität Berlin im Wintersemester 1976/77 aufgenommen. Das "Praktische Jahr" absolvierte ich vom 19.10.1981 bis zum 19.9.1982 am Klinikum Steglitz in den Fächern Chirurgie (Prof. Häring), Innere Medizin (Prof. Riecken) und Frauenheilkunde (Prof. Hörmann). Die ärztliche Prüfung habe ich am 13.10.1982 bestanden. Meine Approbation als Arzt erhielt ich am 29.10.1982 .

Für die herzliche Aufnahme in ihren Kreis und ihre freundliche Unterstützung meiner Arbeit danke ich allen Mitarbeitern des Institutes für Klinische Physiologie.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. U. Hegel, der das Entstehen meiner Dissertation durch die Vergabe des Themas ermöglicht hat. Seine intensive Betreuung hat entscheidend zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen.

Dr. med. Michael Fromm war als Diskussionspartner bei allen Fragen zur Versuchsmethode und zur Auswertung der Ergebnisse ein wesentlicher Förderer meiner Arbeit.

Ursula Lempart und Sieglinde Lüderitz danke ich für ihre Hilfestellung bei der Durchführung der Versuche. Ihre Unterstützung ermöglichte mir oft erst, den zeitlichen Anforderungen dieser Dissertation neben meinem Medizinstudium gerecht zu werden.

Paul Weskamp stand mir vor allem bei Fragen zur Meßtechnik mit seinem Rat zur Seite.

